

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GERUSA GABRIELE SENISKI

**ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE *ADAM33* E
SUA CORRELAÇÃO CLÍNICA COM CÂNCER DE MAMA**

Curitiba

2008

GERUSA GABRIELE SENISKI

**ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE *ADAM33* E
SUA CORRELAÇÃO CLÍNICA COM CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia). Área de Concentração em Patologia, Departamento de Patologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientadora: Dra. Giseli Klassen
Departamento de Patologia Básica, UFPR.
Co-orientação: Dra. Anamaria Aranha Camargo.
Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer, SP.

Curitiba

2008

TERMO DE APROVAÇÃO

GERUSA GABRIELE SENISKI

ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE *ADAM33* E SUA CORRELAÇÃO CLÍNICA COM CÂNCER DE MAMA

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Área de Concentração em Patologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Orientadora: Dra. Giseli Klassen
Departamento de Patologia Básica, UFPR.

Dra. Adriana Frohlich Mercadante
Departamento de Patologia Básica, UFPR.

Dra. Enilze M. de Souza Fonseca Ribeiro
Departamento de Genética, UFPR

Dra. Lia Sumie Nakao
Departamento de Patologia Básica, UFPR.

Aos meus pais Maria Elizabeth e Altivo pelo
amor, carinho, apoio, investimentos e por
tudo que sempre fizeram por mim em todos
os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Giseli Klassen pela oportunidade de aprender a pesquisar. Obrigada pela paciência, orientação, ensinamentos e por acreditar na minha capacidade.

À CAPES e CNPq pela Bolsa de Mestrado e pelo suporte financeiro.

Ao Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, à sua mentora Professora Vanete T. Soccol e à atual Coordenadora Edilene de C. Alcântara.

À Dra. Anamaria A. Camargo, minha co-orientadora, que permitiu a continuidade desse projeto de pesquisa, do qual ela foi a mentora. Obrigada também pela disponibilidade do Laboratório de Biologia Molecular e Genômica do Instituto Ludwig.

Ao Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer pelos materiais e linhagens celulares cedidos.

Ao Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná pelo fornecimento das amostras tumorais utilizadas neste trabalho, especialmente aos responsáveis pelo laboratório Dra. Enilze S. F. Ribeiro e pelo Dr. Iglénir João Cavalli, pela disponibilidade de informações sobre as amostras tumorais.

Ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa e Professor Emanuel Maltempi de Souza pelo suporte financeiro através da participação no projeto Milênio. E também pelo essencial e incondicional apoio à utilização do laboratório de Fixação Biológica de Nitrogênio e Biologia Molecular no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Ao Dr. Emanuel Maltempi de Souza do Departamento de Bioquímica pela orientação em vários momentos no percurso do uso de técnicas de biologia molecular.

Ao Valter A. de Baura por cuidar de colocar as amostras e fazer o seqüenciamento e pela disponibilidade em ajudar sempre. O mundo precisava de mais gente com essa boa vontade em ajudar as pessoas.

À Dona Roseli Prado, pelo preparo de reagentes, meios de cultura, autoclavação dos materiais e simpatia constante.

À Dona Julieta Pie sempre disposta secretariando o projeto Milênio.

Aos colegas de laboratório: Mariana, Edneia, Elisa, Guilherme, Simone, Cristiane, Fernando, Gleyse e Dra. Lia pela convivência e apoio.

Ao Laboratório de Neurobiologia, do Departamento de Patologia, pela disponibilidade de materiais, equipamentos e do laboratório de Cultivo Celular.

Ao Dr. Sílvio M. Zanata pela total disponibilidade de uso do laboratório de Neurobiologia.

Ao Dr. Roberto Andreattini, do Departamento de Farmacologia, pelos ensinamentos de bioestatística e pela disponibilidade dos programas de estatística utilizados neste trabalho.

À Michele M. M. Costa que me ensinou e ajudou com muita paciência a fazer Western Blotting desde a extração das proteínas.

Aos alunos e professores do Departamento de Bioquímica por dividir conosco os equipamentos e laboratórios, além de nos fornecer reagentes e nos ajudar a usar os equipamentos, principalmente à professora Rose Adele e aos alunos Ana Cláudia, Helisson, Marco Antônio, Marco Aurélio, Michele, Gustavo, e especialmente à Michelle e à Márcia por dividirem bancada, materiais e problemas comuns.

Aos alunos do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do

Departamento de Genética: Márcia, Giovana, Sarah, Marcos, Constanza, pela paciência em nos atender e ajudar com as amostras e informações clínico-patológicas das pacientes.

Ao Dr. Rubens S. Lima pela disponibilização de amostras do banco de tumores e das informações das pacientes.

À Valéria Paixão, Felícia P. Cavalher e Maria Cristina do Instituto Ludwig pelas amostras e ajuda com as técnicas quando estive no Laboratório de Biologia Molecular e Genômica do Instituto Ludwig.

À Mariana pela amizade e companheirismo durante os muitos experimentos, aulas e trabalhos que executamos juntas.

À Edneia pela amizade, carinho, ajuda, conversas e experimentos que ela fez para me ajudar! Muito Obrigada por ter sido uma grande colega de laboratório, colaboradora desse trabalho e acima de tudo amiga fora do laboratório!

Aos meus pais pelo apoio e incentivo. Muito obrigada pela dedicação e paciência!

À minha irmã Fabiane pela amizade e apoio de sempre.

Aos meus familiares que sempre me deram incentivo.

Ao Ricardo, que além de estar presente nas horas mais difíceis me dando apoio emocional, forneceu materiais ao laboratório.

Ao meu namorado Rafael que me deu muito apoio na etapa final deste trabalho, pela presença constante, carinho, paciência, dedicação, amor, compreensão e ajuda.

RESUMO

A proteína ADAM33 é membro de uma família de glicoproteínas transmembrânicas formadas por multidomínios. O nome desta família protéica faz menção aos seus domínios disintegrina e metaloproteinase (ADAM – a disintegrin and metalloproteinase). As proteínas que fazem parte desta família são capazes de promover interações célula-célula e célula-matriz extracelular, através de seu domínio disintegrina, e de atuar na clivagem proteolítica de citocinas, fatores de crescimento e seus respectivos receptores, através do domínio metaloproteinase. As propriedades dos membros da família ADAM, de atuar na proteólise e adesão celular, as tornam candidatas a mediar ambos, remodelamento de matriz extracelular e mudanças na adesão celular que caracterizam certos processos patológicos no desenvolvimento tumoral. Além disso, a atividade catalítica de liberação de citocinas e fatores de crescimento parece direcionar a migração celular e controlar várias vias de sinalização ativadas no câncer, além de que distintas ADAMs podem modular a migração celular mediada por integrinas. Já foi visto que um dos membros desta família, a ADAM23 apresenta hipermetilação da região promotora de seu gene com conseqüente silenciamento gênico e este evento parece estar correlacionado com a progressão tumoral e metástase no câncer de mama. Neste trabalho, damos continuidade ao estudo da participação desta família de proteínas no câncer de mama, analisando o padrão de expressão com relação à presença de metilação na região promotora do gene *ADAM33*. A análise da expressão de *ADAM33* em linhagens tumorais de mama por RT-PCR revelou uma redução significativa da expressão deste gene com relação à linhagem normal de célula epitelial de mama, sendo que em 65% das linhagens tumorais o gene encontra-se desligado. O silenciamento gênico acarretou na ausência da proteína ADAM33 confirmada por um ensaio de Western Blotting. O uso do agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina sugeriu o envolvimento da metilação na regulação da expressão deste gene. Utilizando a metodologia do tratamento de DNA com bissulfito de sódio seguida de seqüenciamento, foi possível confirmar que o silenciamento gênico se dá, na maioria dos casos, devido à presença de metilação em ilhas de CpG na região promotora deste gene. Com estes dados, foi possível analisar o padrão de metilação em amostras de tumores primários de mama através da técnica de MSP. A presença de metilação na região promotora do gene *ADAM33* foi detectada em 39,7% das amostras. A correlação entre o padrão de metilação e os dados clínico-patológicos das pacientes não apresentou associação estatisticamente significativa para as variáveis: grau tumoral (SBR), estágio clínico (TNM), tamanho do tumor, presença de RE, RP e ERBB2, acometimento de linfonodos, metástase e recidiva, porém a diferença apareceu quando comparados os tipos de tumor: carcinoma ductal invasivo e carcinoma lobular invasivo. A frequência de metilação em carcinomas lobulares invasivos foi de 76,2% comparados com 25,5% em carcinomas ductais invasivos, o que dá uma diferença estatisticamente significativa com $p=0,0002$. O desligamento do gene *ADAM33* pode estar relacionado com a característica destes tumores de apresentarem aparência histológica descoesiva com falta de adesão entre as células.

Palavras-chave: ADAM33. Câncer de mama. Metilação. MSP.

ABSTRACT

The ADAM33 protein is member of a transmembrane glycoproteins family composed by multidomains. This protein family name makes mention to its domains disintegrin and metalloproteinase (ADAM - a disintegrin and metalloproteinase). The ADAM proteins are capable to promote cell-cell and cell-extracellular matrix interactions, through their disintegrin domain, and to act in cytokines, growth factors and their respective receptors proteolitical cliveage, through the metalloproteinase domain. The ADAM family members properties, of acting in proteolysis and cellular adhesion, turn them candidates to mediate both, extracellular matrix remodeling and changes in cellular adhesion that characterize certain pathological processes in cancer development. Besides, the shedding activity of cytokines and growth factors seems to address the cellular migration and to control several signaling pathways activated in cancer, in addition different ADAMs can modulate the cellular migration mediated by integrins. It was already seen that one of this family members, ADAM23 presents promoter's hypermethylation with consequent gene silencing, and this event seems to be correlated with tumour progression and metastasis in breast cancer. In the present work, we give continuity to the study of this protein family's participation in breast cancer, analyzing the expression pattern and the relationship with *ADAM33* promoter's methylation. The expression analysis of *ADAM33* in tumour breast lineages through RT-PCR revealed that 65% of tumour cell lines the gene were silenced, a significant downregulation of this gene with regard to the normal breast cell line. The gene regulation caused ADAM33 protein absence confirmed by Western Blotting assay. The demethylating agent 5-aza-2'-deoxycitidine suggested the methylation involvement into downregulation of this gene. Using DNA sequencing sodium bisulfite methodology, it was possible to confirm that gene silencing, in most of cases, is due to *ADAM33* CpG islands hypermethylation. With these data, it was possible to analyze the methylation status in breast primary tumour samples through MSP. The *ADAM33* promoter hypermethylation was detected in 39,7% of samples. The correlation between methylation pattern and the patients' clinical-pathological data didn't present statistical significative association at the variables: tumoral degree (SBR), clinical stage (TNM), tumor size, RE, RP and ERBB2 presence, limph node attempt , metastasis and reincidence, however the difference appeared when compared the tumor types: invasive ductal carcinoma and invasive lobular carcinoma. The methylation frequency in invasive lobular carcinomas was 76,2% compared with 25,5% in invasive ductal carcinomas, what gives a statistical significant difference with $p=0,0002$. The *ADAM33* gene silencing can be related with the hystological discoesive appearance characteristic of this kind of tumor with lack of cellular adhesion.

Key words: ADAM33. Breast cancer. Methylation. MSP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura da glândula mamária.....	23
Figura 2.	Esquema de progressão tumoral em câncer de mama.....	23
Figura 3.	Esquema das principais modificações epigenéticas.....	33
Figura 4.	Representação do dinucleotídeo CpG e do grupamento metila a ser inserido no carbono 5 da citosina (5-metilcitosina).....	34
Figura 5.	Representação esquemática da metilação como mecanismo de inativação gênica.....	35
Figura 6.	Representação esquemática de uma proteína da Família ADAM contendo seus domínios.....	41
Figura 7.	Uma visão geral das ADAMs na biologia do câncer. Cinco diferentes vias podem estar envolvidas na mediação da proliferação celular e progressão do câncer pelas ADAMs.....	45
Figura 8.	Estrutura do domínio catalítico da proteína ADAM33 complexada com marimastat.....	49
Figura 9.	Esquema de um fragmento de 2000 pares de base da região promotora e 1000 pares de base do início da região codificante do gene <i>ADAM33</i>	63
Figura 10.	Seqüência de DNA de um fragmento da região 5' do gene ADAM 33 contendo a ilha-1 de CpG.....	65
Figura 11.	Seqüência de DNA de um fragmento da região 5' do gene ADAM 33 contendo a ilha-2 de CpG.....	66
Figura 12.	Porção da ilha-1 de CpG do gene <i>ADAM33</i> onde estão destacadas as regiões escolhidas para o desenho dos iniciadores para MSP.....	72
Figura 13.	Gráficos representativos das ilhas de CpG presentes na região promotora (2kb a montante 1 kb a jusante da região 5' UTR) do gene <i>ADAM33</i>	75
Figura 14.	Southern Blotting a partir de reações de RT-PCR do gene <i>ADAM33</i> (painel superior) e do gene de expressão constitutiva <i>GAPDH</i> (painel inferior) no painel de linhagens tumorais de mama.....	76
Figura 15.	RNA total extraído da linhagem HB4a.....	77
Figura 16.	RT-PCR do gene de expressão constitutiva <i>GAPDH</i> em linhagens de mama.....	78
Figura 17.	RT-PCR do gene <i>ADAM33</i> em linhagens de mama.....	79
Figura 18.	Eletroforese SDS PAGE dos extratos protéicos das linhagens celulares corados com Coomassie Blue.....	80
Figura 19.	Western Blotting da proteína ADAM33 (acima) e da proteína constitutiva Hsp70 (abaixo) em extratos protéicos das linhagens celulares.....	81
Figura 20.	Re-expressão do gene ADAM 33 após o tratamento das linhagens com o agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina.....	82
Figura 21.	DNA genômico extraído das linhagens celulares de mama.....	82
Figura 22.	Controle da eficiência do tratamento com bissulfito de sódio - fragmento do gene SATR-1 amplificado por PCR <i>nested</i>	84
Figura 23.	Ilha-1 de CpG do gene <i>ADAM33</i> amplificada por PCR <i>nested</i>	84
Figura 24.	Eletroforese dos produtos de PCR <i>nested</i> (fragmentos da ilha-1 do gene <i>ADAM33</i>) extraídos do gel de agarose.....	85
Figura 25.	PCR de colônia da ilha-1 do gene <i>ADAM33</i> clonada a partir da linhagem HB4a em DH10B.....	85

Figura 26.	DNA plasmidial extraído de 8 colônias de DH10B transformadas com a ilha-1 <i>ADAM33</i> da linhagem MCF7.....	86
Figura 27.	Gráficos representativos das porcentagens de metilação de cada dinucleotídeo CpG das linhagens celulares.....	89
Figura 28.	Esquema representativo do mapa de restrição do fragmento amplificado por PCR <i>nested</i> contendo a ilha-1 de CpG do gene <i>ADAM33</i>	90
Figura 29.	COBRA da ilha-1 do gene <i>ADAM33</i>	91
Figura 30.	Ilha-2 do gene <i>ADAM33</i> amplificada por PCR <i>nested</i>	91
Figura 31.	Esquema representativo do mapa de restrição do fragmento amplificado por PCR <i>nested</i> contendo a ilha-2 de CpG do gene <i>ADAM33</i>	92
Figura 32.	COBRA da ilha-2 do gene <i>ADAM33</i>	92
Figura 33.	Padronização da Técnica MSP nas linhagens tumorais.....	93
Figura 34.	Teste de sensibilidade da técnica de MSP.....	94
Figura 35.	Aspecto dos DNAs tumorais extraídos a partir de 8 amostras de tumores primários das pacientes em estudo.....	95
Figura 36.	Controle da eficiência do tratamento com bissulfito de sódio - fragmento do gene <i>SATR-1</i> amplificado por PCR <i>nested</i>	95
Figura 37.	MSP do gene <i>ADAM33</i> em amostras de fibroadenomas.....	96
Figura 38.	MSP do gene <i>ADAM33</i> em amostra de carcinoma ductal <i>in situ</i> . 10 bp é o marcador de massa molecular.....	96
Figura 39.	MSP do gene <i>ADAM33</i> em amostras de carcinoma ductal invasivo de grau I (SBR).....	97
Figura 40.	MSP do gene <i>ADAM33</i> em amostras de carcinoma ductal invasivo de grau II (SBR).....	98
Figura 41.	MSP do gene <i>ADAM33</i> em amostras de carcinoma ductal invasivo de grau III (SBR).....	98
Figura 42.	MSP do gene <i>ADAM33</i> em amostras de carcinoma lobular invasivo de grau I (SBR).....	99
Figura 43.	MSP do gene <i>ADAM33</i> em amostras de carcinoma lobular invasivo de grau II (SBR).....	99
Figura 44.	MSP do gene <i>ADAM33</i> em amostras de carcinoma lobular invasivo de grau III e grau indeterminado (SBR).....	99
Figura 45.	Gráfico de frequência de metilação do promotor do gene <i>ADAM33</i> em carcinomas ductais e lobulares.....	103

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES EM ESTÁDIOS.....	29
TABELA 2 - INICIADORES PARA MSP.....	72
TABELA 3 - QUANTIFICAÇÃO DOS RNAS EXTRAÍDOS PELO ESPECTROFOTÔMETRO GENEQUANT II (PHARMACIA BIOTECH).....	77
TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DOS EXTRATOS DAS LINHAGENS CELULARES DETERMINADA PELO MÉTODO DE BRADFORD (1976).....	80
TABELA 5 - QUANTIFICAÇÃO DOS DNAS EXTRAÍDOS DE LINHAGENS TUMORAIS.....	83
TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO CATEGÓRICA DOS DADOS CLÍNICOS DAS PACIENTES ANALISADAS E A FREQUÊNCIA DE METILAÇÃO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>ADAM33</i> AVALIADAS PELO TESTE DO QUI-QUADRADO OU TESTE EXATO DE FISCHER.....	102
TABELA 7 - DISTRIBUIÇÃO CATEGÓRICA DOS DADOS CLÍNICOS DAS PACIENTES COM CARCINOMA LOBULAR INVASIVO E A FREQUÊNCIA DE METILAÇÃO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>ADAM33</i> AVALIADAS PELO TESTE EXATO DE FISCHER.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs - Absorbância
 ACS - Sociedade Americana de Câncer
 ADAM - A Disintegrin And Metaloproteinase
 AJCC - The American Joint Committee on Cancer
 AML - Leucemia mielóide aguda
 APS - Persulfato de amônio
 BCL2 - B-cell CLL/lymphoma 2 Gene
 BCRJ - Banco de células do Rio de Janeiro
 BLAST - Basic Alignment Search School
 BRCA1 - Breast Cancer Gene 1
 BWS - Síndrome de Beckwith-Wiedemann
 CDKN2A - Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2a (Melanoma, P16, Inhibits Cdk4)
 CDKN2B - Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2b (P15, Inhibits Cdk4)
 cDNA - DNA complementar
 COBRA - Combined Bissulfite Restriction Analysis
 COX2 - cyclooxygenase 2
 CpG - Citosina - Fosfato - Guanidina
 DNA - Ácido desoxirribonucléico
 DNMT - DNA metil transferase
 dNTP - Desoxinucleotídeo fosfato
 DEPC - dietilpirocarbonato
 EDTA - Etilenodiamino tetraacetato
 EGF - Epidermal Growth Factor
 EGFR - Epidermal Growth Factor Receptor
 EMBL - European Bioinformatics Institute
 ER - Receptor de Estrógeno
 ERBB2 - v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
 GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
 GSTP1 - Glutathione S-transferase pi
 H19 - Imprinted Maternally Expressed Transcript
 HB-EGF - Heparin-Binding Epidermal Growth Factor
 HC - Hospital de Clínicas

HCl - Ácido Clorídrico
 HDAC - Histona deacetilase
 HER-2 - Human Epidermal Growth Factor Receptor
 HIN1 - Hairpin-Induced 1
 HNSG - Hospital Nossa Senhora das Graças
 HTGS - High Throughput Genome Sequences
 ICF - Immunodeficiency, centromeric region instability and facial anomalies
 IDC - Carcinoma ductal invasivo
 IGF-1 - Insulin-like Growth Factor 1
 IGFBP3 - Insulin-like Growth Factor Binding Protein 3
 ILC - Carcinoma lobular invasivo
 Kb - quilo bases
 kDa - quilo Daltons
KIT - V-Kit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene Homolog
 KIT - Stem Cell Factor Receptor
 LINE - Long Interspersed Nuclear Elements
 MAP - Mitogen-Activated Protein
 MBDs - Methyl Binding Domain Proteins
 MDC - Metaloproteinase-like, Disintegrin-like, Cystein-rich
 $MgCl_2$ - Cloreto de Magnésio
 MMP2 - Metaloproteinase de Matriz 2
 MLH1 - mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)
 MSP - Methylation Specific PCR
 Na_2HPO_4 - Fosfato de sódio
 NaCl - Cloreto de sódio
 NaOH - Hidróxido de sódio
 NCBI - National Center of Biotechnology Info
 Nr - Non-redundant
 p15 - proteína de 15 kiloDaltons
 p16 - proteína de 16 kiloDaltons
 p53 - proteína de 53 kilo Daltons
 pb - pares de base
 PCR - Reação em cadeia da polimerase
 PDGF - Platellet Derived Growth Factor

pH - Potencial hidrogeniônico
 PKC - Protein Kinase C
 PLAU - Plasminogen Activator, Urokinase
 PTGS2 - prostaglandin-endoperoxide synthase 2
 PVDF - Decafluoreto de polivinil
 RARB - Retinoic Acid Receptor β
 RASSF1 - Ras-Association Domain Family Member 1
 RB1 - Gene do Retinoblastoma 1
 RGD - Arginina-Glicina-Aspartato
 RNA - Ácido ribonucleico
 RNAm - RNA mensageiro
 RT-PCR - Reverse Transcriptase PCR
 SATR-1 - Região satélite 1
 SBR - Sistema de Scarff-Bloom e Richardson
 SCF - Stem Cell Factor
 SDS - Dodecil Sulfato de Sódio
 SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrilamide Gel Electrophoresis
 SNP - Single Nucleotide Polymorphism
 SPSS - Statistical Package for Social Science
 TACE - TNF Converting Enzyme
 TDLU - Unidade Terminal ducto-lobular
 TEMED - N,N,N',N'-tetrametilenodiamina
 TES - Tris-EDTA-SDS
 TGF α - Transforming Growth Factor α
 THRA - Thyroid Hormone Receptor, Alpha (Erythroblastic Leukemia Viral (V-Erb-A) Oncogene Homolog, avian)
 THRB - Thyroid Hormone Receptor, Beta (Erythroblastic Leukemia Viral (V-Erb-A) Oncogene Homolog 2, Avian)
 TNF α - Tumor Necrosis Factor α
 TNM - Tumor Node Metastasis – Sistema de Classificação Tumoral
 TP53 - Tumour protein p53
 Tris - Tris (Hidroximetil) amino metano
 TWIST1 - Twist Homolog 1 (Acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen Syndrome) (Drosophila)

UICC - Union Internationale Contre le Cancer

VEGF - Vascular Endothelial Growth Factor

VHL - Von Hippel Lindau Tumour Supressor

VCAM-1 - Vascular Cell Adhesion Molecule 1

uPAR - Plasminogen Activator, Urokinase Receptor

UTR - Untranslated Regions

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	CÂNCER DE MAMA.....	20
1.2	TIPOS DE CÂNCER DE MAMA.....	24
1.3	ESTADIAMENTO DO CÂNCER E SISTEMA TNM.....	28
1.4	MARCADORES MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA.....	30
1.5	EPIGENÉTICA E CÂNCER.....	32
1.6	FAMÍLIA ADAM E CÂNCER.....	39
1.7	ADAM33.....	47
2	OBJETIVOS.....	54
2.1	OBJETIVOS GERAIS.....	54
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	54
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	55
3.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	55
3.2	CULTIVO DE CÉLULAS.....	56
3.3	AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE <i>ADAM33</i> EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA.....	56
3.3.1	Extração de RNA.....	57
3.3.2	Obtenção da Primeira Fita de cDNA.....	58
3.3.3	RT- PCR do Gene <i>ADAM33</i>	58
3.3.4	Eletroforese em Géis de Poliacrilamida 8%.....	59
3.3.5	Extração de Proteínas.....	60
3.3.6	Western Blotting.....	60
3.3.7	Tratamento das Linhagens Tumorais com o Agente Desmetilante 5-Aza-2'-Deoxicitidina.....	61
3.4	CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE <i>ADAM33</i> EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA.....	61
3.4.1	Identificação das Ilhas de CpG do Gene <i>ADAM33</i>	62
3.4.2	Desenho dos Iniciadores.....	62
3.4.3	Extração de DNA.....	66

3.4.4	Tratamento de DNA com Bissulfito de Sódio.....	67
3.4.5	Reação de PCR <i>Nested</i> para Clonagem da Ilha de CpG.....	68
3.4.6	Clonagem das Ilhas de CpG do Gene <i>ADAM33</i>	68
3.4.7	Minipreparação de Plasmídeos.....	69
3.4.8	Reação de Seqüenciamento.....	70
3.5	ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO ATRAVÉS DO MÉTODO COBRA (COMBINED BISSULFITE RESTRICTION ANALYSIS).....	70
3.6	ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE <i>ADAM33</i> EM TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA PELA TÉCNICA DO TRATAMENTO DE DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO SEGUIDO DE PCR ESPECÍFICO PARA METILAÇÃO (MSP).....	71
3.7	CORRELAÇÃO ENTRE O PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE <i>ADAM33</i> NOS TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA E OS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS PACIENTES.....	73
3.7.1	Obtenção dos Dados Clínico-patológicos.....	73
3.7.2	Análise Estatística dos Dados.....	73
4	RESULTADOS	74
4.1	IDENTIFICAÇÃO DE ILHAS DE CPG NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>ADAM33</i>	75
4.2	ESTUDO DA EXPRESSÃO DO GENE <i>ADAM33</i>	75
4.3	SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>ADAM33</i> DE LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA, ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO E SUA CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO GÊNICA.....	82
4.4	CORRELAÇÃO DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS COM OS RESULTADOS DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE <i>ADAM33</i> EM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA.....	93
4.4.1	Methylation Specific PCR (MSP).....	93
4.4.2	Análise Estatística dos Dados Clínico-patológicos Correlacionados com a Metilação da Região Promotora do Gene <i>ADAM33</i>	100
5	DISCUSSÃO	105
6	CONCLUSÕES	112
	REFERÊNCIAS	113

ANEXO 1 - ESTADIAMENTO CLÍNICO.....	125
ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO.....	128
ANEXO 3 - TABELA DE METILAÇÃO DOS DINUCLEOTÍDEOS CpG DA ILHA-1 DO GENE <i>ADAM33</i>.....	129
ANEXO 4 - TABELA DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS 76 PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA OU FIBOADENOMA UTILIZADOS EM ANÁLISES DE MSP E RESULTADOS DA TÉCNICA.....	131

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer é o maior problema público de saúde em muitos países. Atualmente, uma em cada quatro mortes nos Estados Unidos da América (EUA) é devida ao câncer (JEMAL *et al.*, 2008). Em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Os principais tipos de câncer com maior mortalidade foram: de pulmão (1,3 milhão); de estômago (cerca de 1 milhão); de fígado (662 mil); de cólon (655 mil); e de mama (502 mil) (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA, 2008).

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. Para o ano de 2008 foram estimadas aproximadamente 40.930 mortes decorrentes de câncer de mama nos EUA. Entre as mulheres americanas, a probabilidade de desenvolver câncer de mama em algum momento da vida é de uma em cada oito mulheres (13%) e o risco de óbito decorrente deste tipo de tumor é de uma em cada três (33%) mulheres (JEMAL *et al.*, 2008). No Brasil, o câncer de mama é o tipo de câncer que mais causa morte entre as mulheres, sendo a segunda causa de morte por doença no sexo feminino. O número de casos novos de câncer de mama esperados para o Brasil em 2008 é de 49.400, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2008).

O câncer de mama é uma doença extremamente heterogênea e apresenta uma grande variabilidade clínica e histopatológica. Sua etiologia também é complexa sendo influenciada tanto por fatores exógenos, como dieta, consumo de álcool, uso de contraceptivos orais entre outros, como por fatores endógenos, como as taxas hormonais e predisposição genética (RADICE e REDAELLI, 2003). Outros fatores de risco que influenciam o desenvolvimento desta doença incluem: a idade avançada, a menarca precoce (antes dos 12 anos), a menopausa tardia (após os 50 anos), a nuliparidade ou a primeira gravidez após os 30 anos, a localização geográfica (país de origem) e o *status* sócio-econômico (INCA, 2008).

O prognóstico desta doença é relativamente bom se diagnosticado em estádios iniciais, sendo a sobrevida média global após 5 anos na população mundial

em torno de 61% (INCA, 2008). O acometimento dos linfonodos axilares, o tamanho do tumor, o tipo histológico, o grau histológico, o grau nuclear, os níveis de progesterona e estrógeno, a velocidade de proliferação tumoral e a competência imunológica do portador da doença constituem os principais parâmetros empregados para a determinação do prognóstico do câncer de mama (FARIA, 1999; BRASILEIRO FILHO, 2000; VIANA, MARTINS e GEBER, 2001). A constatação de linfonodos axilares afetados ratifica o potencial de metastização do tumor. A dimensão do tumor está associada, em geral, à sobrevida dos pacientes e ao nível de comprometimento axilar. Certos tipos histológicos fornecem um prognóstico favorável, como os carcinomas tubular, colóide e papilar, ou o oposto, como o carcinoma inflamatório, considerado o tipo histológico de pior prognóstico. A partir da análise da diferenciação histológica do tumor em relação às células mamárias normais (ANEXO 1), os tumores foram divididos em grau I, bem diferenciado; grau II, moderadamente diferenciado e grau III, indiferenciado (quanto mais diferenciado, melhor o prognóstico). Tumores com receptores hormonais positivos (estrógeno e progesterona) são geralmente mais diferenciados e apresentam um melhor prognóstico (FARIA, 1999; BRASILEIRO FILHO, 2000; VIANA, MARTINS e GEBER, 2001).

A metástase representa a principal causa de morte para pacientes com câncer de mama. Aproximadamente 10 a 15% das pacientes com tumor de mama apresentam doenças agressivas que recidivam em até 3 anos após o diagnóstico inicial da doença. Entretanto, não é incomum o aparecimento de metástases em sítios distantes 10 ou mais anos após a identificação do tumor primário (STEEG, 2004). Os sítios mais comuns de formação de metástases são ossos, pulmão e fígado (LEE, 1983). De acordo com a Sociedade Americana de Câncer (ACS), quando diagnosticado em estádios iniciais, o câncer de mama pode ser tratado com cirurgia conservadora e as taxas de sobrevida livre de doença em 5 anos para pacientes com doença local e sem envolvimento metastático dos linfonodos axilares são superiores a 95%. Em caso de espalhamento regional da doença, as taxas de sobrevida diminuem para 83%. Entretanto, quando há presença de metástases em outros órgãos, as taxas de sobrevida diminuem drasticamente, reduzindo-se a aproximadamente 26% (JEMAL *et al.*, 2008).

Existem diversos tratamentos contra o câncer de mama, que incluem as cirurgias (tumorectomia, quadrantectomia, mastectomia), a radioterapia e a

quimioterapia. Recentemente, tem sido investigada uma possível aplicação da imunoterapia e da modulação da resposta biológica neste contexto (VIANA, MARTINS e GEBER, 2001). Os métodos de diagnóstico também são numerosos. Combinando-se o auto-exame, o exame clínico palpatório, a mamografia, a termografia de placa e a ecografia tem-se uma acuidade de até 95% no diagnóstico da doença. Para confirmação do diagnóstico, devem-se efetuar outros exames e testes, incluindo a biópsia, que determina o tipo específico de câncer, e, por conseguinte, os tratamentos específicos (VIANA, MARTINS e GEBER, 2001). Esta combinação de métodos possibilita a detecção de carcinomas menores que 1 cm, no entanto tem um custo bastante elevado (ABRÃO, 1995). Entretanto, 70% dos casos de câncer de mama são diagnosticados tardiamente no Brasil, dificultando muito o tratamento e a cura (HOSPITAL A. C. CAMARGO, 2006). Para avaliar a presença de doença metastática, utilizam-se exames complementares que incluem o Raio-X de tórax, a cintilografia óssea e a tomografia computadorizada (VANPOZNAK e SEIDMAN, 2002).

A maior parte dos casos de câncer de mama pertence à classe dos carcinomas que se originam na região final dos ductos que se associam às estruturas acinares. Esta região é designada de unidade terminal ducto-lobular (TDLU). As TDLUs (FIGURA 1) são consideradas as unidades funcionais da mama (WÄRRI, SAARINEN, MÄKELÄ, 2006). Clinicamente, este tipo de câncer pode apresentar desde formas não invasivas, ou “in situ”, cuja proliferação celular está restrita à membrana basal, até formas em estádios mais avançados, ou invasivas, cuja proliferação invade a membrana basal e o tecido adjacente, e até formas altamente metastáticas, atingindo outros tecidos (FIGURA 2) (NAKHLIS E MORROW, 2003; YUAN *et al.*, 2005).

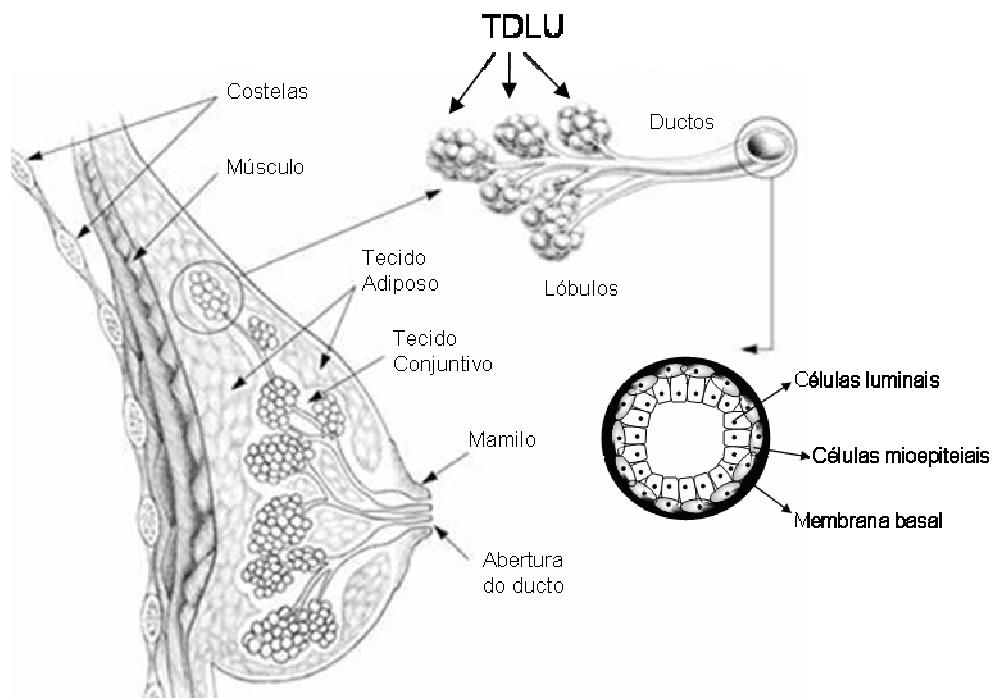


Figura 1. Estrutura da glândula mamária.

Fonte: Adaptado de DIMRI, BAND e BAND, 2005.

Nota: As TDLUs (unidades terminais ducto-lobulares) são compostas por células ductais e acredita-se que nestas unidades surge a maioria dos tumores de mama. O estroma é composto por tecido adiposo e fibroblastos. A mama normal é caracterizada pela presença de duas linhagens: epitelial luminal e mioepitelial.

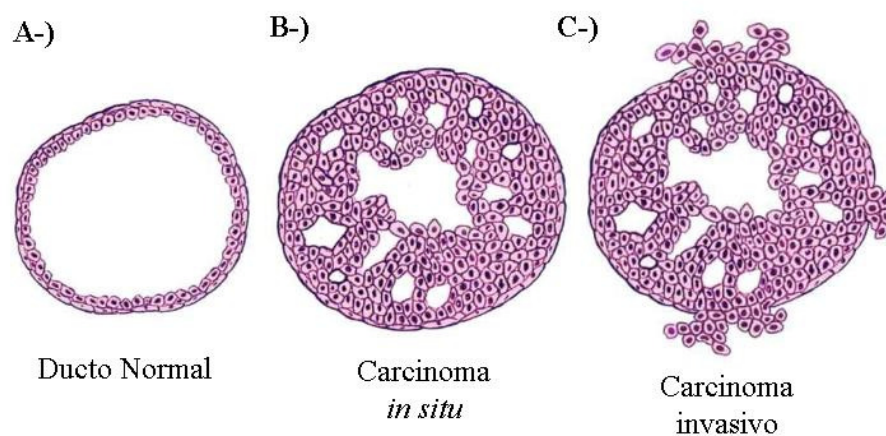


Figura 2. Esquema de progressão tumoral em câncer de mama.

Fonte: Modificado de BREAST..., 2007.

1.2 TIPOS DE CÂNCER DE MAMA

Os sarcomas, correspondentes a menos de 1% das neoplasias malignas que comprometem as mamas, são, em geral, assintomáticos, podem atingir grandes dimensões e tem origem nos tecidos conjuntivos. Habitualmente, estão vinculados à metástase via hematogênica, sendo os pulmões e os ossos os principais alvos (VIANA, MARTINS e GEBER, 2001).

Os carcinomas (tumores malignos de origem epitelial) são classificados, quanto à localização e extensão, em carcinoma *in situ* e invasor e, de acordo com a origem, são classificados em ductal ou lobular (MENKE *et al.*, 2006). A terminologia “ductal” e “lobular” ainda é usada por razões históricas, mas hoje não há evidências que sugerem que estes tumores são derivados de células epiteliais ductais ou lobulares. Desta maneira, as diferenças na sua morfologia são adequadas para refletir as diferenças nos mecanismos de carcinogênese ao invés da origem anatômica das lesões (TURASHVILI *et al.*, 2007).

A principal diferença entre os carcinomas *in situ* e invasor está no fato de que o primeiro origina-se dentro dos ductos como uma proliferação atípica do epitélio ductal, que, eventualmente preenche e oblitera os ductos com células neoplásicas. Sempre que o tumor permanecer limitado pela membrana basal do ducto, esse se constitui em um carcinoma intraductal (não infiltrante). Enquanto o do tipo invasor infiltra o estroma, independentemente da coexistência do componente *in situ* (MENKE *et al.* 2006).

O carcinoma ductal *in situ* representa a forma inicial, não invasiva e com bom prognóstico. À mamografia aparecem como microcalcificações lineares, ramificadas ou em pequenos agrupamentos heterogêneos (FARIA, 1999; BRASILEIRO FILHO, 2000; VIANA, MARTINS e GEBER, 2001). Estudos apontam que aproximadamente 25 a 30% dos casos sem intervenção cirúrgica (mastectomia), que apresentam focos microscópicos deste carcinoma, podem desenvolver, em um intervalo de 15 anos, o carcinoma invasivo (PAGE e ANDERSON, 1987).

O carcinoma lobular *in situ* corresponde de dez a 30% dos carcinomas *in situ* e representa um fator de alto risco para o desenvolvimento do câncer invasor de mama (FARIA, 1999; BRASILEIRO FILHO, 2000). Caracteriza-se pela hiperplasia lobular anormal e multicentricidade (existência de um carcinoma em um quadrante distinto daquele onde está o tumor principal). Ocorre, em geral, na área central da

mama e no quadrante superior externo. Cerca de 50% desta neoplasia se desenvolve na mama oposta à biopsiada (FARIA, 1999).

O carcinoma ductal invasivo (IDC), correspondente a 75% dos carcinomas de mama, pode apresentar: (1) regiões de necrose, de microcalcificação, de carcinoma *in situ*; (2) estroma geralmente fibroso; (3) massa palpável endurecida, com dois a três centímetros, em média (FARIA, 1999; BRASILEIRO FILHO, 2000). Em geral, cerca de dois terços dos casos já possui metástases ganglionares na ocasião do diagnóstico (PAGE e ANDERSON, 1987; FARIA, 1999).

Todos os IDCs são caracterizados pela formação de túbulos ou ductos que se infiltram através do parênquima de suporte da mama (YODER *et al.*, 2007). As características citológicas variam muito, podendo ser encontradas desde células pequenas com núcleos homogêneos até células grandes com núcleos irregulares e hipercromáticos. Nas margens da massa tumoral, as células neoplásicas infiltram-se para dentro do estroma e do tecido fibroadiposo e, com freqüência, há uma invasão dos espaços perivasculares e perineurais, bem como dos vasos sangüíneos e linfáticos (MENKE *et al.*, 2007). Aproximadamente 20% dos IDCs podem ser categorizados em subtipos específicos tais como tubular, medular, mucinoso, papilar, micropapilar ou metaplásico. Cada subtipo é definido por características histopatológicas e citológicas únicas. Os 80% restantes de IDCs não são subclassificados, sendo chamados carcinomas ductais “sem outra especificação”. Comparados com carcinoma ductal sem outra especificação, os subtipos tubular, papilar e medular apresentam melhor prognóstico, enquanto os subtipos micropapilar e metaplásico são de pior prognóstico (YODER *et al.*, 2007).

As características genômicas dos IDCs estão mais fortemente associadas ao grau histológico (SBR) do que ao subtipo histológico. Os IDCs de grau 1 possuem relativamente poucas alterações cromossomais, com maior freqüência de aberrações ocorrendo como perdas genômicas em 16q e ganhos genômicos em 1q. Outras alterações incluem ganhos genômicos em 8q, 11q, 16p e 17q, e perdas genômicas em 1p, 8p, 11q, 13q e 22q. Aspectos adicionais de IDCs de baixo grau são: tendência a ser diplóide, apresentar baixa atividade mitótica, ser tipicamente receptor de estrógeno (ER) positivo, na maioria das vezes não possuir amplificação de *ERBB2* e freqüentemente superexpressar ciclina D1 (YODER *et al.*, 2007).

Em contraste com tumores de baixo grau, IDCs de alto grau (grau 3 SBR) possuem mais extensas e complexas alterações genéticas. As alterações mais

notáveis são ganhos genômicos em 8q, 17q e 20q, freqüentemente perdas em 17p e perdas pouco freqüentes em 16q. Outras alterações genômicas comumente relatadas em IDCs grau 3 são ganhos em 1q (numa proporção bem menor do que em tumores de grau 1), e perdas em 1p, 19p e 19q. IDCs de graus elevados tendem a ser ER negativos, apresentam freqüentemente perda de função de *TP53*, usualmente superexpressam *MYC* e *ERBB2*, apresentam aneuploidia e têm um alto índice mitótico (YODER *et al.*, 2007).

O carcinoma lobular invasivo (ILC) representa cerca de 10% dos casos de câncer de mama, possui bom prognóstico e sobrevida de dez anos em 80 a 90% dos casos. Apresenta-se como uma massa palpável ou lesão mal definida e difusa, sendo, neste caso, dificilmente detectada por mamografia. Em aproximadamente 60% dos casos verifica-se associação desse carcinoma ao carcinoma lobular *in situ* (FARIA, 1999; BRASILEIRO FILHO, 2000). Os aspectos histopatológicos que descrevem os exemplos clássicos de lesões lobulares são populações de pequenas células aberrantes com pequenos núcleos, ácinos individuais e falta de coesão entre as células. Os nucléolos geralmente não são visíveis, as mitoses são raras ou esparsas na maioria dos casos. O padrão de crescimento é distinto, com arranjo linear de células locadas entre feixes de colágeno formando as chamadas “filas indianas”. Estes arranjos freqüentemente se orientam envolta de estruturas fixas tais como ductos de maneira espiralada (MARTINEZ e AZZOPARDI (1979) e FISCHER *et al.* (1975) *apud* HANBY e HUGHES, 2008).

A principal característica molecular específica de carcinomas lobulares invasivos e carcinomas lobulares *in situ* é a perda ou hipo-expressão de E-caderina (*CDH1*). A perda de expressão ocorre pela combinação de perda de heterozigose, mutação gênica ou silenciamento do promotor que levam à inativação bialélica do gene. O restante do perfil molecular dos ILCs é distintivo, porém não é inteiramente único. Eles são tipicamente negativos para EGFR1 e ERBB2 e positivos para citoqueratinas 1, 5, 10 e 14, ER e PR. Porém, é importante observar que alguns carcinomas ductais apresentam este mesmo perfil (ARPINO *et al.*, 2004). Estudos citogenéticos mostram que os ILCs possuem poucas alterações quando comparados com outro tipo de câncer de mama. As modificações clássicas são a perda de 16q e ganho de 1p e, em termos de números gerais de modificações, ILCs se assemelham a carcinomas ductais de grau 1. Estudos moleculares recentes sugerem que existem outras modificações específicas e características observadas em ILCs, sendo uma

delas a amplificação do gene do receptor de fator de crescimento de fibroblastos no locus complexo 8p11.2 (HANBY e HUGHES, 2008).

Existem também associações de distintas características biológicas nos ILCs, incluindo um risco aumentado de doença bilateral, multifocalidade com lesões descontínuas, propensão aumentada a metástases para cólon intestinal e propagação para sítios incomuns, dos quais os componentes gastrintestinais são os preferidos (HANBY e HUGHES, 2008).

Os carcinomas lobulares invasivos acometem mais comumente mulheres de idade igual ou superior a 50 anos e estão correlacionados estatisticamente ao abuso de álcool, como fator de risco. Muitos autores estabelecem subtipos de carcinoma lobular invasivo, sendo eles: sólido, alveolar, pleomórfico e tubular. Estes subtipos podem aparecer puros ou associados. Como um grupo, estas lesões variantes apresentam pior prognóstico do que a forma clássica (HANBY e HUGHES, 2008).

O Carcinoma Inflamatório constitui de 1 a 3% dos cânceres de mama e sua apresentação clínica caracteriza-se pelo predomínio dos fenômenos inflamatórios da pele da mama (flogose, eritema, aumento da temperatura local e nítido edema com espessamento cutâneo). É uma das formas mais agressivas de câncer de mama. Essa apresentação clínica resulta da embolização tumoral em vasos linfáticos dérmicos. O quadro pode evoluir para lesões ulcerativas. A maioria das pacientes possui um carcinoma invasivo subjacente, geralmente de volume grande e de localização central. De fato, tal carcinoma não representa um tipo histológico, e sim uma entidade clínica. Normalmente, o tipo histológico de origem é o carcinoma ductal invasor e, raramente, um carcinoma lobular invasor e mucinoso (MENKE *et al.*, 2007).

A Doença de Paget representa 0,7 a 4% dos cânceres de mama. Caracteriza-se por alteração unilateral do mamilo e/ou da aréola, que pode incluir vesículas areolares recorrentes, eczema eritematoso crônico, lesão psoriática e até uma lesão erosiva. Prurido e aumento da sensibilidade são freqüentes. Em praticamente todos os casos, é encontrada lesão maligna subjacente: carcinoma intraductal em 65% e carcinoma ductal invasivo em 30% das vezes. Aproximadamente 60% das pacientes com doença de Paget apresentam massa palpável, e as demais, geralmente, têm mamografias alteradas. Na microscopia observam-se células claras grandes com núcleos atípicos, denominadas células de Paget, concentradas na membrana basal da epiderme. A origem dessas células é

controversa. A teoria mais aceita é a de que a célula migraria de um tumor intraparenquimatoso, através dos ductos, até o epitélio papilar. Outra hipótese sugere o inverso: que a célula maligna se originaria da própria epiderme. O prognóstico depende da presença ou não de lesão subjacente (MENKE *et al.*, 2007).

O tumor Filodes, antigamente chamado de cistossarcoma filodes, é uma neoplasia composta por elementos epiteliais e mesenquimais de comportamento bastante variável. Não é muito freqüente, representando 2 a 3% dos tumores fibroepiteliais. Apresenta maior freqüência entre os 30 e 40 anos de idade. Macroscopicamente, o tumor é arredondado, bem-circunscrito e firme, apresentando diâmetros que variam de menos de 5 até 20 cm, apresenta áreas sólidas e degeneração cística, pode haver necrose e hemorragia. Microscopicamente, apresenta hiper celularidade estromal e elementos glandulares benignos. A recorrência local é encontrada em aproximadamente 20% dos casos, com taxas similares para lesões benignas e malignas. Metástases à distância ocorrem em menos de 5% de todos os tumores filodes e em aproximadamente 25% dos classificados histologicamente como malignos. As metástases são de origem estromal, preferentemente hemáticas, e quase não há disseminação para linfonodos regionais (MENKE *et al.*, 2007).

1.3 ESTADIAMENTO DO CÂNCER E SISTEMA TNM

A determinação do estadio do câncer de mama baseia-se em conceitos de localização da doença e tamanho do tumor, acometimento de linfonodos regionais e presença de metástases à distância. Os tumores de mama são classificados usando os critérios estipulados pelo sistema de classificação TNM criado pela AJCC (*The American Joint Committee on Cancer*) e UICC (*Union Internationale Contre le Cancer*). Este sistema (ANEXO 1) baseia-se no tamanho do tumor (T), no envolvimento de linfonodos (N) e na presença de metástases distantes (M) (STYBLO e WOOD, 1998). A Tabela 1 mostra resumidamente a classificação dos tumores pelo sistema TNM.

TABELA 1 – CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES EM ESTÁDIOS

	T	N	M
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II A	T0	N1	M0
	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estádio II B	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
Estádio III A	T0	N2	M0
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1/N2	M0
Estádio III B	T4	N0/N1/N2	M0
Estádio III C	Qualquer T	N3	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: INCA, 2006.

O TNM atual ressalta a importância do número de linfonodos acometidos no carcinoma mamário diagnosticado e a importância na precisão do diagnóstico. A presença de metástases em linfonodos axilares e o tamanho do tumor são os principais fatores prognósticos, porém, em aproximadamente 30% dos casos sem acometimento de linfonodos a paciente vem a óbito por causa da doença, ressaltando a necessidade de identificação de fatores prognósticos adicionais (RADICE e REDAELLI, 2003).

A necessidade de apontar as pacientes que têm um risco aumentado de recorrência da doença e uma pior evolução clínica tem conduzido muitos estudos voltados para a identificação de novos fatores prognósticos para o câncer de mama. Atualmente, uma das áreas mais promissoras na pesquisa contra o câncer é a identificação de marcadores moleculares tumorais que possam ser utilizados como ferramentas no diagnóstico, prognóstico e tratamento de pacientes com câncer.

1.4 MARCADORES MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA

As características moleculares dos diversos tumores estão sendo estudadas e exploradas com o objetivo de se determinar o risco de desenvolvimento da doença, o prognóstico global e a resposta aos tratamentos (quimioterapia e radioterapia). Alguns exemplos de genes envolvidos no processo de tumorigênese da mama e que estão sendo utilizados como marcadores moleculares são: o oncogene *ERBB2*, os receptores de hormônios esteróides (receptor de estrógeno e receptor de progesterona), o gene supressor de tumor *TP53*, o receptor de ácido retinóico β , o gene *PDGF* (*Platlet Derived Growth Factor*), o gene *VEGF* (*Vascular Endothelial Growth Factor*) (KEEN e DAVIDSON, 2003).

O gene *ERBB2*, também denominado HER-2 ou neu, localizado no cromossomo 17q21, está superexpresso em aproximadamente 20% a 25% dos carcinomas ductais de mama, mas estes índices podem aumentar para 40% em casos de pacientes com invasão de linfonodos (linfonodo positivas – L+). Esse oncogene codifica uma glicoproteína transmembrana contendo 185 kDa, denominada de p185^{erb}, que é semelhante ao receptor do fator de crescimento epidérmico e possui atividade tirosina-quinase em sua porção carboxi-terminal (SILVA, SADDI, MOMOTUK, 2002). Em geral, mulheres com carcinoma invasivo *ERBB2* positivo possuem uma doença mais agressiva, com uma probabilidade maior de reincidência, um pior prognóstico e uma sobrevida menor, quando comparadas com as mulheres *ERBB2* negativo (HENRY e HAYES, 2006).

Em 1992, foi desenvolvido o anticorpo monoclonal Herceptin, também designado de trastuzumab, que se liga com grande afinidade ao domínio extracelular do *ERBB2*, impedindo a sinalização de crescimento desencadeada pelo *ERBB2*. O tratamento apenas com Herceptin produziu resposta anti-tumoral em 15-20% das pacientes com metástase de carcinoma de mama e, em associação aos outros quimioterápicos (doxorrubicina, ciclofosfamida ou paclitaxel), o Herceptin aumentou a eficácia da quimioterapia, com aumento geral da sobrevida (OLIVEIRA, SANTOS, KANAMURA, ALVES, 2003).

O receptor de estrógeno também é importante no contexto do câncer de mama, por mediar os efeitos do estrógeno. Dois terços de todos os tumores são receptor de estrógeno positivo (ER+) (GRUVBERGER *et al.*, 2001). Tumores mais agressivos, com pouca diferenciação celular, apresentam pouca ou nenhuma

expressão de RE (MILLIS, 1980; CLARKE *et al.*, 1994). Os receptores de estrógeno, após ligação ao estrógeno, mudam de conformação e se ligam diretamente ao DNA, controlando a transcrição de genes específicos (LEADER, WANG, FU, PESTELL, 2006). A expressão gênica do ER é controlada por mecanismos epigenéticos que incluem a metilação do seu promotor e a compactação da cromatina pela acetilação/desacetilação das histonas (LEADER, WANG, FU, PESTELL, 2006).

Clinicamente, a terapia endócrina com drogas anti-estrógenos ou inibidores da aromatase são utilizadas nos casos em que os tumores apresentam ER+. Assim o anti-estrógeno tamoxifen liga-se ao receptor tornando-o não funcional, enquanto os inibidores de aromatase reduzem os níveis de estrógenos. A maioria dos tumores ER+ são inicialmente responsivos ao tamoxifen. Os inibidores de aromatase tais como o anastrozol e letrozol são especialmente usados em pacientes que se tornam resistentes ao tamoxifen. Entretanto existem pacientes que se tornam resistentes a essas duas abordagens de tratamento (IKEDA e INOUE, 2004).

O gene receptor de progesterona (PR), importante para o desenvolvimento da glândula mamária e do aparelho reprodutor feminino, codifica duas isoformas, hPRA, com 79 kDa, e hPRB, com 109 kDa (LINHARES *et al.*, 2005). hPRB é um ativador transcricional mais forte que a hPRA, enquanto este atua como inibidor do hPRB e de outros receptores, como o ER, receptor de glicocorticóide, andrógeno e mineralocorticóide (GRAHAM *et al.*, 2005). O ER é o principal ativador transcricional da isoforma hPRB. O PR promove a proliferação celular e pode ser expresso em tecidos normais e neoplásicos (LIU, ZHANG, ZHANG, YANG, 2004). Normalmente, em tecidos normais, as células expressam as duas isoformas em níveis equivalentes; enquanto que, em tumores, predomina a expressão de uma isoforma, geralmente a hPRA. Pacientes com câncer de mama, linfonodo positivos, e que expressam predominantemente hPRA possuem pior prognóstico e respondem menos ao tratamento com hormônios que mulheres com maior expressão de hPRB. No entanto, casos com hiperexpressão de hPRB podem ser mais resistentes à quimioterapia (GRAHAM *et al.*, 2005). A perda de expressão deste receptor e do ER constitui um potencial mecanismo de resistência à terapia hormonal e, em ambos os casos, a hipermetilação do promotor desses genes têm papel importante neste contexto (LIU, ZHANG, ZHANG, YANG, 2004).

Além desses marcadores moleculares já estabelecidos para o câncer de mama, novos genes com potencial diagnóstico e prognóstico têm sido amplamente

estudados. Podemos citar algumas integrinas, como a integrina $\alpha 6\beta 4$ que parece ter um valor prognóstico quando analisada em conjunto com a laminina-5; o gene *PLAU* (uPA), que possui expressão elevada em tumores de mama e parece estar associado a um pior prognóstico, e o gene *PTGS2* (COX2) cuja expressão está associada a um pior prognóstico e a uma menor sobrevida global livre de doença (KEEN e DAVIDSON, 2003).

1.5 EPIGENÉTICA E CÂNCER

As alterações genéticas que levam ao câncer incluem amplificação gênica, deleções, mutações de ponto, perda de heterozigose e rearranjos cromossômicos. Além dessas, tem-se destacado o estudo de alterações epigenéticas (BAYLIN, 2002; ANTEQUERA, 2003).

Epigenética é o termo aplicado a mudanças herdáveis na expressão de um gene sem alteração na sequência de DNA. Nos últimos anos, diversos trabalhos indicam que as mudanças epigenéticas têm um papel essencial na tumorigênese. As principais alterações epigenéticas que ocorrem durante o desenvolvimento de um tumor são anormalidades na metilação (hipermetilação) de genes supressores de tumor e modificações das histonas na cromatina (MOMPARLER, 2003), além de hipometilação genômica global, hipometilação gene-específica de oncogenes e perda de “imprinting” (FEINBERG, OHLSSON e HENIKOFF, 2006).

Dois principais mecanismos epigenéticos (FIGURA 3) que acarretam na alteração da estrutura tridimensional da molécula de DNA, com conseqüentes mudanças na expressão gênica, compreendem a modificação covalente do DNA e/ou das histonas (VERMA e SRIVASTAVA, 2002; WAGGONER, 2007).

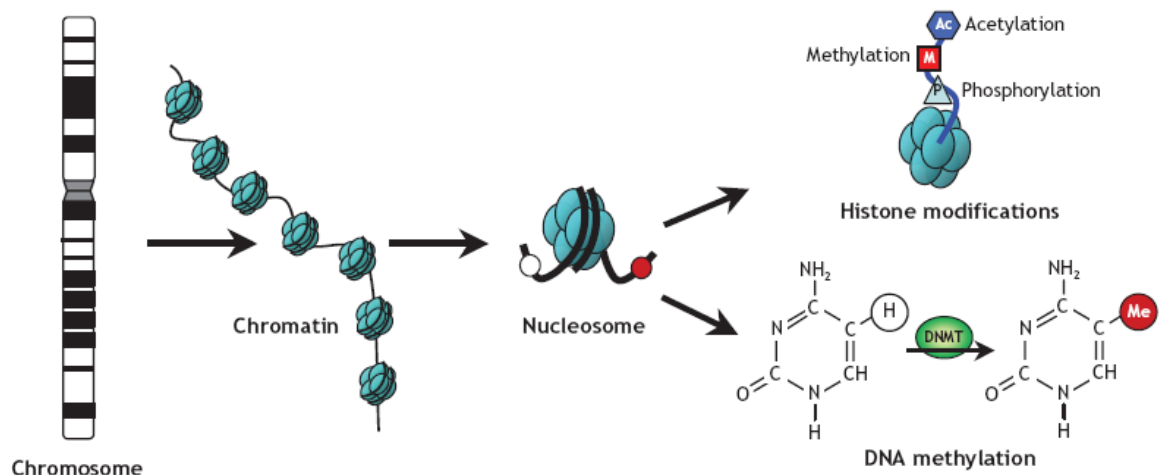


Figura 3. Esquema das principais modificações epigenéticas.

Fonte: RODENHISER e MANN, 2006.

Nota: Em eucariotos, 146 pb de DNA genômico envolve um octâmero de histonas (composto de duas cópias das histonas H2A, H2B, H3 e H4) para formar a unidade básica da cromatina, os nucleossomos. A cromatina, por sua vez, é condensada para formar uma estrutura ainda mais compacta, o cromossomo. As modificações epigenéticas, embora herdáveis, são reversíveis, ocorrem ao nível de DNA e/ou de histonas e regulam a organização da cromatina, bem como a expressão de genes.

A metilação no carbono 5 de citosinas dos dinucleotídeos CpG (FIGURA 4) é uma característica de genomas eucarióticos e é um dos principais mecanismos epigenéticos de regulação da expressão gênica. A transferência do grupo metil ao carbono 5 da citosina é catalisada pelas DNA metiltransferases (DNMTs). Aproximadamente 60 - 90% dos dinucleotídeos CpG dispersos pelo genoma são metilados enquanto que as regiões ricas em CpG denominadas “Ilhas de CpG” são desmetiladas (NAKAO, 2001). Gardiner-Garden e Frommer (1987) definem uma ilha de CpG como uma região de DNA maior que 200 pb que contém pelo menos 50% de G+C e uma razão entre o observado e o esperado da frequência de dinucleotídeos CG maior ou igual a 0,6. Estima-se que 60% dos genes humanos são associados a ilhas de CpG. Por análises computacionais do genoma humano calcula-se que existam aproximadamente 29 mil ilhas de CpG (VENTER *et al.*, 2001). A localização destas Ilhas de CpG não é randômica no genoma, localizando-se preferencialmente na região promotora dos genes. Sabe-se que estas ilhas são encontradas nas proximidades de genes de expressão constitutiva e em 40% das regiões promotoras de genes que apresentam expressão tecido-específica (NAKAO, 2001).

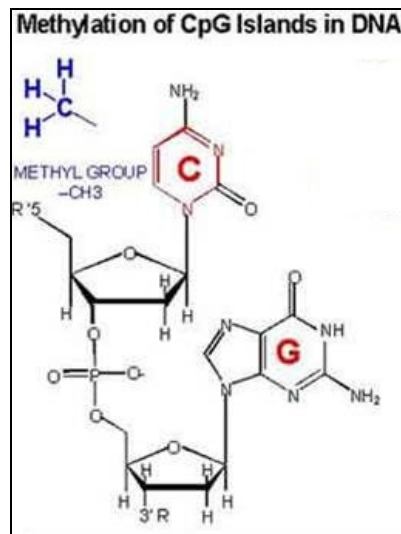


Figura 4. Representação do dinucleotídeo CpG e do grupamento metila a ser inserido no carbono 5 da citosina (5-metilcitosina).

Fonte: Modificado de DESIGNED UNIVERSE, 2006.

A presença de ilhas de CpG foi correlacionada com a estrutura gênica quando observou-se que as regiões do genoma acessíveis a nucleases, e, portanto, ativas transcricionalmente, continham DNA hipometilado. Este dado associado ao fato de que, estas ilhas se localizam preferencialmente na região promotora dos genes, sugeriu um papel importante destas regiões na regulação da expressão gênica. De modo geral, a presença de metilação nas ilhas de CpG das seqüências promotoras dos genes pode ser correlacionada com o silenciamento gênico (FIGURA 5) (ESTELLER, 2002).

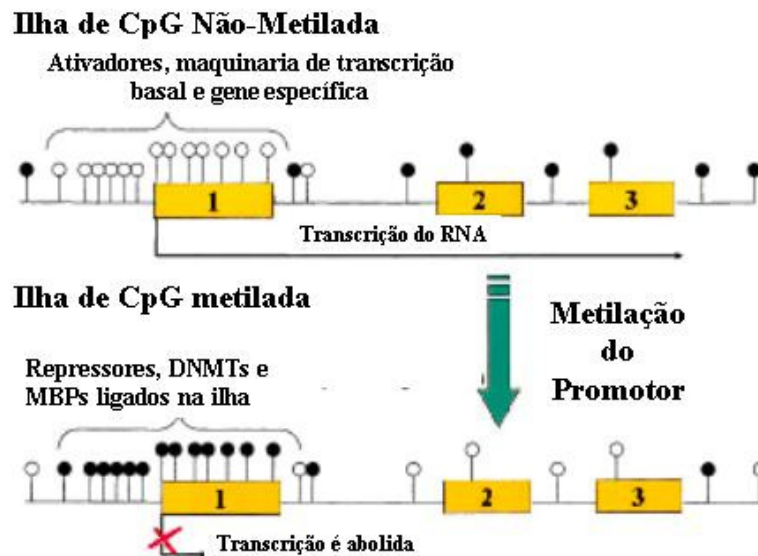


Figura 5. Representação esquemática da metilação como mecanismo de inativação gênica.

Fonte: Modificado de ESTELLER, 2002.

Nota: As caixas amarelas representam os éxons do gene, os círculos representam dinucleotídeos CpG. Os círculos pretos representam a presença do grupamento metil na citosina, os círculos brancos denotam ausência deste.

Vários mecanismos foram propostos para explicar o papel da metilação na diminuição da atividade transcricional. Em um primeiro modelo foi proposto que os resíduos de citosina metilados poderiam interferir diretamente na interação de fatores de transcrição aos seus sítios de ligação, uma vez que o grupo metil se projeta no sulco maior da dupla fita de DNA. Além desta interferência direta, um segundo modelo propõe que a metilação dos dinucleotídeos CpG tenha consequência direta no posicionamento nucleossomal precedendo a montagem desta estrutura. Dessa forma, a estrutura nucleossômica compactada silencia mais eficientemente a transcrição do que a estrutura convencional da cromatina (ESTELLER, 2005). Atualmente, sabe-se que a informação armazenada por ilhas de CpG hipermetiladas é, em parte, interpretada por proteínas que se ligam a resíduos metilados *Methyl Binding Domain Proteins* (MBDs). As MBDs são importantes “tradutoras” entre a metilação do DNA e genes modificadores de histonas que estabelecem um ambiente de cromatina transcricionalmente inativo (ESTELLER, 2007). Sabe-se que as MBDs podem recrutar complexos protéicos contendo co-repressores e histonas deacetilases (HDACs) e, com base nessa interação, foi proposto que a ligação destes complexos ao DNA levaria a uma mudança na

estrutura da cromatina impedindo a transcrição (YANG, YAN e DAVIDSON, 2001).

A maioria das modificações nas histonas ocorre nas suas caudas amino-terminais. Várias modificações são compatíveis com o silenciamento gênico. Em geral, a desacetilação das histonas leva ao silenciamento gênico, enquanto a acetilação leva à ativação gênica. Deste modo, ilhas de CpG hipermetiladas são conhecidas por exibir um código de modificação de histonas, caracterizado especialmente por hipoacetilação e metilação, que deve ser lido por fatores nucleares (JENUWEIN, 2001 e TURNER, 2002 *apud* ESTELLER, 2007). Outras conexões encontradas foram que as DNMTs também são capazes de recrutar HDACs, enquanto de outro lado, ambas DNMTs e MBDs recrutam histona metiltransferases (HMTs) que modificam a lisina 9 da histona H3 (ESTELLER, 2007).

A metilação do DNA está envolvida em vários processos biológicos normais, como o “imprinting” genômico e a inativação do cromossomo X. Mutações em genes que afetam o padrão global de metilação podem dar origem a várias doenças, como é o caso da síndrome do X frágil que pode ser causada pela metilação *de novo* da região 5’ não transcrita do gene *FMR1*, o que gera, em determinadas condições, um sítio frágil no cromossomo X. Em níveis mais globais, a Síndrome ICF (Immunodeficiency, centromeric region instability and facial anomalies) é causada por mutações no gene da DNMT3b, que é uma enzima essencial no estabelecimento dos padrões de metilação. Várias síndromes herdadas também são geradas devido à falta do “imprinting” genômico, como é o caso da síndrome de Angelman, a síndrome de Prader-Willi e a síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS) (EGGER *et al.*, 2004).

Alterações nos padrões normais de metilação são aspectos comuns em células transformadas. Vários estudos revelaram que alterações no padrão de metilação são eventos primários no processo de tumorigênese e contribuem diretamente para transformação das células normais (PRADHAN e ESTEVE, 2003). A possível associação entre metilação e câncer surgiu da observação de que grande parte dos genes supressores de tumor continha ilhas de CpG nas suas regiões promotoras e geralmente apresentavam alterações nos padrões de metilação nas células transformadas em relação ao tecido normal (TEODORIDIS, 2004). Análises do padrão global de metilação em células tumorais sugerem que diferentes tipos de tumores apresentam padrões de metilação específicos e, no geral, foi visto que em processo de transformação maligna, regiões normalmente metiladas, como

elementos repetitivos, perdem substancialmente a metilação e se tornam hipometiladas, enquanto que genes que contém ilhas de CpG normalmente não metiladas, como é o caso de alguns genes supressores de tumor, são silenciados em decorrência de um aumento na densidade de metilação de seus promotores (CLARK e MELKI, 2002). A análise do padrão global de metilação em diferentes tipos de tumores tem demonstrado que a metilação de algumas ilhas de CpG acontece em vários tipos de tumores enquanto outras são metiladas apenas em tipos de tumores específicos (PARRELLA *et al.*, 2004).

Estudos envolvendo inibidores de metilação *in vivo* e *in vitro* e análises de camundongos deficientes em DNA-metiltransferases indicam a importância da hipometilação na tumorigênese (EHRLICH, 2002). Foi proposto que a hipometilação contribui para a malignidade da célula por estar agindo diretamente na ativação de certos oncogenes, como é o caso do *THRA* (*ERBA1*) e do *BCL2* em leucemia linfocítica crônica (LIPSANEN, 1988), e por estar agindo também na ativação de retrotransposons latentes, como o *Long Interspersed Nuclear Elements* (LINE) e/ou na instabilidade cromossômica (EHRLICH, 2002).

A hipermetilação de regiões específicas na célula tumoral contribui na progressão da doença por estar relacionada principalmente com o seu potencial na inativação gênica. As regiões que se tornam metiladas são, normalmente, ilhas de CpG de promotores de certos genes envolvidos na regulação do ciclo celular, no reparo de DNA, na resistência a drogas, na detoxificação, na diferenciação celular, na apoptose e no desenvolvimento de metástase (CLARK e MELKI, 2002). Desta maneira, uma alteração epigenética pode levar a lesões genéticas, um evento de hipermetilação que muda todo o ambiente molecular da célula. Isso é bem comum quando o silenciamento ocorre em genes de reparo como MMR (*DNA Mismatch Repair*), fazendo com que aconteça o acúmulo de mutações no DNA, principalmente em genes regulatórios chave que conseqüentemente vão evoluir para o câncer (ESTELLER, 2007).

A primeira constatação da presença de metilação em ilhas de CpG de um gene supressor de tumor humano foi feita por Greger *et al.*, em 1989, quando estudavam o gene de retinoblastoma. Desde então, as descrições de inativação gênica por metilação em células tumorais vêm crescendo na literatura. Entre os genes regulatórios normalmente metilados em células tumorais além do gene *RB1* em retinoblastomas (como citado anteriormente), também o gene *VHL* em

carcinomas esporádicos de células renais, o *H19* em tumores de Wilm's, o *CDKN2B* (p15) em leucemias e o *CDKN2A* (p16) em várias linhagens tumorais (BEN-KAUS *et al.*, 2005).

Em tumores de mama, muitos estudos têm analisado o perfil de metilação durante a formação e progressão da doença. Entre os genes comumente metilados nesses tumores podemos citar o receptor de estrógeno (ER), Progesterona (PR), a E-caderina, o *RASSF1*, o *SCGB3A1* (HIN1), o *TWIST1*, a ciclina D2, o *RARB*, o *THRB*, o *BRCA1* e o *GSTP1* (LIU, ZHANG, ZHANG, YANG, 2004; BAE *et al.*, 2004; ESTELLER, 2005).

Diferente das mutações de ponto e cromossômicas, as mudanças epigenéticas são reversíveis, aumentando a possibilidade do desenvolvimento de terapias baseadas na restauração do estado normal de genes associados ao câncer. Tem sido proposta a ação anti-tumoral de agentes desmetilantes, principalmente os derivados da molécula 2'-deoxicitidina, assim como de inibidores de histona deacetilases tais como SAHA (suberoylanilide hidroxamic acid), partindo do princípio de que estes agentes podem reativar a expressão de genes supressores de tumor e da observação de que estes agentes podem restaurar a sensibilidade de tumores a alguns agentes quimioterápicos (EGGER *et al.*, 2004; ESTELLER, 2005). Os agentes desmetilantes são moléculas fosforiladas, análogas a nucleotídeos e são incorporados à fita do DNA durante a replicação. Uma vez incorporados, eles complexam com as DNMTs e as inativam impedindo a metilação do DNA (ESTELLER, 2005). Apesar de alguns desses agentes, tais como 5-aza-2'-deoxicitidina já estarem sendo usados clinicamente, é preciso ter muita cautela sobre seus efeitos, tendo em vista que as modificações epigenéticas causadas por estas drogas são globais e podem levar à ativação de muitos genes não sendo possível prever seu efeito final no organismo do paciente. Enfim, poderia ser possível o desenvolvimento de terapia epigenética para modificações epigenéticas chave ou gene-específicas, usando, por exemplo, fatores de transcrição projetados para um alvo específico ou microRNA (FEINBERG, OHLSSON e HENNIKOFF, 2006).

Além das possibilidades terapêuticas, a identificação de mudanças no padrão de metilação em tumores pode gerar marcadores moleculares para o diagnóstico e prognóstico do câncer (BROCK, 2001). Uma vantagem clara do estudo da metilação de genes como marcadores moleculares em tumores é que, para cada

câncer, a hiper ou hipometilação acontece sempre na mesma região de um determinado gene, ao contrário das mutações, que ocorrem em qualquer porção dos genes e podem ser de diferentes tipos. Além disso, a hipermetilação pode ser detectada mesmo em meio a um grande número de células normais, enquanto outras alterações genéticas como as perdas de heterozigose (LOH) ou deleções homozigóticas não são detectadas nesse contexto (ESTELLER, 2002). A relevância disso tem sido reforçada pelo emprego de tecnologia genômica para estudo diferencial da metilação de genes em larga escala, através de análise de microarranjo de amostras de tecidos normais e de câncer. Esses trabalhos correlacionam perfis de metilação alterados em determinados dinucleotídeos CpG com a progressão para a doença maligna (ADORJAN *et al.*, 2002) e associam a hipometilação global a um pior prognóstico ou recorrência após o tratamento (WEI *et al.*, 2002). No novo modelo do progenitor epigenético do câncer, proposto por Feinberg, Ohlsson e Hennikoff (2006) ressalta-se a importância dos marcadores moleculares epigenéticos na detecção precoce do câncer, tendo em vista que as alterações epigenéticas ocorreriam nos estágios iniciais da progressão tumoral, provavelmente fornecendo a identidade das diferentes células-tronco progenitoras de câncer, as quais sofreriam expansão clonal (origem policlonal do câncer). Dessa forma, seria possível diagnosticar um câncer por alterações epigenéticas específicas, encontradas nos fluidos corporais, por exemplo, antes mesmo do tumor se instalar.

1.6 FAMÍLIA ADAM E CÂNCER

A Família ADAM (**A** *Disintegrin* **A**nd **M**etaloproteinase), também chamada de MDC (**M**etaloproteinase-like, **D**isintegrin-like, **C**ysteine-rich), é um subgrupo da superfamília de metaloproteinases dependentes de zinco e é composta, até o momento, por 40 membros que foram descritos em vertebrados e em várias outras espécies incluindo *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* e *Xenopus laevis*. Porém, não há relatos na literatura da descrição dos membros desta família em *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* ou em plantas. Em fungos foram descritas duas novas ADAMs em *Aspergillus fumigatus* (LAVENS *et al.*, 2005) e o fungo *Schizosaccharomyces pombe* possui uma proteína que parece ser uma forma

progenitora de proteínas da família ADAM Z98844. Além disso, até o momento, apenas 24 dos membros desta família foram descritos em humanos (UNIVERSITY OF VIRGINIA SCHOOL OF MEDICINE, 2005).

Sabe-se que as proteínas que fazem parte desta família são capazes de promover interações célula-célula e célula-matriz extracelular e de atuar na clivagem proteolítica de citocinas, fatores de crescimento e seus respectivos receptores. Os membros da família ADAM estão envolvidos em processos biológicos complexos como, por exemplo, a miogênese, a adipogênese, a neurogênese e a fertilização (PRIMAKOFF e MYLES, 2000; SEALS e COURTNEIDGE, 2003). O envolvimento de alguns membros da família em processos patológicos, como inflamação, artrite reumatóide, hipertrofia cardíaca, asma, Alzheimer e câncer, também já foi descrito. Além disso, a utilização de inibidores de ADAMs como terapia em várias doenças já foi proposto (MOSS e BARTSCH, 2004).

As proteínas que fazem parte da Família ADAM são glicoproteínas transmembranas ou secretadas. Muitos membros possuem várias isoformas que são produtos de processamento alternativo (*splicing*), os quais podem exercer a mesma função ou funções distintas na célula (principalmente as isoformas secretadas) (PRIMAKOFF e MYLES, 2000; SEALS e COURTNEIDGE, 2003).

Os membros desta família são proteínas formadas por multidomínios (Figura 6). Entre eles estão os domínios metaloproteinase, que tem a função de clivagem proteolítica, e o domínio disintegrina, que tem função de adesão celular. Os outros domínios que formam a proteína são: uma sequência sinal, que direciona a proteína ao seu sítio de atividade; um pró-domínio, que tem função de bloquear a atividade de protease; uma região rica em cisteína que conecta as ADAMs a moléculas de superfície celular, podendo interagir com sindecans, que podem facilitar interações célula-célula e célula-matriz, possuindo também função de adesão; um domínio EGF-like, com função supostamente de fusão de membranas (ITO *et al.*, 2007); um domínio transmembrana, que ancora a proteína à membrana da célula; e uma cauda citoplasmática que atua como sinalizador intracelular sendo passível de fosforilação (PRIMAKOFF e MYLES, 2000; SEALS e COURTNEIDGE, 2003).



Figura 6. Representação esquemática de uma proteína da Família ADAM contendo seus domínios.
Fonte: Modificado de SEALS e COURTNEIDGE, 2003.

Tipicamente o pró-domínio mantém a atividade enzimática destas proteínas inativa e sua remoção ativa o domínio de metaloproteinase, além disso, este domínio tem uma função secundária de chaperonina que parece realizar o enovelamento correto da proteína. A remoção do pró-domínio é feita através da ação de convertases, como a furina, ou através de auto-catálise (SEALS e COURTNEIDGE, 2003).

O domínio de metaloproteinase para ser ativo depende da presença da sequência consenso de aminoácidos HEXGHXXGXXHD. Em metaloproteinases de matriz (MMPs), os três resíduos de histidina (H) deste sítio constituem os três ligantes de zinco e o resíduo de ácido glutâmico (E) é o sítio ativo. Apesar da conservação deste sítio catalítico, a característica estrutural distinta de cada membro da família deve determinar a especificidade de seu substrato e de seus inibidores. Algumas proteínas da família ADAM possuem este domínio inativo por apresentarem um ou mais resíduos de aminoácidos diferentes nesta região, incompatíveis com a atividade enzimática. Esse é o caso das ADAMs 2-7, 11, 14, 16, 18, 22, 23, 27 e 29. Os membros, 1, 8-10, 12, 13, 15-17, 19-21, 24-26, 28, 30 e 33, que possuem a sequência consenso ativa de metaloproteinase têm um papel biológico importante no processamento (clivagem, ativação e liberação de ectodomínios) de proteínas da superfície celular (atividade de *shedase*) e proteólise de componentes da matriz extracelular. Estes processos são críticos no remodelamento da superfície celular, na regulação da disponibilidade de fatores de crescimento e na modulação da capacidade das células de responderem a estímulos extracelulares (STAMENKOVIC, 2000).

O domínio de disintegrina tem função de adesão tanto célula-célula como célula-matriz extracelular e age como ligante de integrinas na superfície celular (LENDECKEL *et al.*, 2004). As disintegrinas foram, inicialmente, descritas como proteínas solúveis e pequenas. Estas moléculas são componentes do veneno de cobra *Viperidae* que interferem eficientemente com a agregação de plaquetas pela sua ligação com a integrina $\alpha 11\beta 3$, via seqüência RGD, resultando no impedimento da ligação das plaquetas com seus ligantes naturais, como o fibrinogênio (SAGANE, 1999). O domínio de ligação à integrina nos membros da família ADAM possui aproximadamente 90 aminoácidos e algumas ADAMs apresentam uma seqüência de tripeptídeo (arginina, lisina, ácido aspártico - RGD) característica que é exposta em um *loop* flexível da estrutura protéica e determina, junto com as regiões adjacentes, a especificidade e afinidade das ADAMs às diferentes integrinas. Porém, existem algumas integrinas que não reconhecem RGD, mas se ligam a resíduos de ácido aspártico na proteína (BECK *et al.*, 2005).

As integrinas são uma superfamília de receptores de adesão celular que reconhecem ligantes de matriz extracelular, ligantes de superfície celular e ligantes solúveis. Elas são compostas por heterodímeros de subunidades α e β transmembrana, com domínios extracelulares de cada subunidade contribuindo com o sítio de ligação. Quando o ligante está acoplado ao receptor, as integrinas transduzem o sinal para dentro da célula, ou ainda podem receber sinais intracelulares que regulam sua afinidade ao ligante. Desta forma, elas servem como uma conexão transmembrana entre contatos extracelulares (outras células e matriz extracelular) e os microfilamentos de actina do citoesqueleto, cujo comportamento é regulado e modulado pelas integrinas. Esses comportamentos celulares podem ser de adesão, proliferação, sobrevivência ou apoptose, formato, polaridade, mobilidade, haptotaxia, expressão gênica e diferenciação, na maioria ditados pelo citoesqueleto. Portanto, integrinas servem como ambos, sensores do ambiente molecular em que se encontra a célula e efetores que conduzem forças motoras exercidas pelo citoesqueleto e pelo ambiente dinâmico (TAKADA *et al.*, 2007).

Consistente com suas propriedades de ligação com a matriz extracelular, não é surpreendente que as integrinas exerçam um papel crucial durante todos os estágios da metástase, incluindo migração celular, invasão e colonização de tecidos alvo. Modelos animais têm sido usados para demonstrar o requerimento de integrinas durante a atividade metastática na disseminação de tumores primários de

mama para tecidos secundários tais como pulmão. Metástases pulmonares de um modelo experimental xenoenxerto de câncer de mama humano, por exemplo, foi revelado serem enfraquecidas após administração sistêmica de anticorpo inibitório anti- $\beta 1$ integrina. Similarmente, a administração de um peptídeo desenhado para bloquear os receptores $\alpha 5 \beta 1$ e $\alpha v \beta 3$ se apresentou inibitória para o crescimento e metástase de células invasivas de tumor de mama humano (WHITE *et al.*, 2007).

Os resultados do trabalho de Huang *et al.* (2005) indicam que distintas ADAMs podem modular a migração celular mediada por integrinas específicas sendo que pode ser um padrão imposto, ao menos em parte, por seus domínios disintegrinas. Sumariamente, os estudos sobre a interação funcional entre ADAMs e integrinas indicam que as ADAMs podem modular, inibir ou auxiliar a migração celular pelas integrinas independentemente da sua atividade metaloproteinase.

A disponibilidade de fatores de crescimento e seus receptores, assim como as interações célula-célula e célula-matriz são importantes nos processos de proliferação celular, adesão e migração (GIANCOTTI e RUOSLAHTI, 1999). Esses processos, por sua vez, estão diretamente relacionados com processos de formação e progressão tumoral e com a formação de metástases. As propriedades dos membros da família ADAM, de atuar na proteólise e adesão celular, as tornam candidatas a mediar ambos, remodelamento de matriz extracelular e mudanças na adesão celular que caracterizam certos processos patológicos no desenvolvimento tumoral. Além disso, a atividade catalítica de liberação de citocinas e fatores de crescimento parece direcionar a migração celular e controlar várias vias de sinalização ativadas no câncer (ARRIBAS e BECH-SERRA, 2006). Por todas estas evidências, observamos atualmente um aumento na literatura correlacionando a participação de alguns membros desta família tanto no desenvolvimento quanto na progressão tumoral.

O gene *ADAM11* foi originalmente identificado como um gene supressor de tumor em câncer de mama (KATAGIRI, 1995) e a participação de vários membros da família ADAM (ADAMs 9, 10, 11 e 15) parece estar diretamente relacionada com aspectos patológicos de tumores hematológicos (WU, 1997). O gene *ADAM10* apresenta a sua expressão aumentada em feocromocitomas e neuroblastomas e a expressão dos genes das ADAMs 9, 10 e 17 é regulada por hormônios andrógenos na linhagem celular de tumor de próstata LNCaP (MCCULLOCH, 2000). Outro membro desta família gênica, a *ADAM17*, tem um papel importante na progressão

tumoral pela sua participação na ativação proteolítica de precursores de fatores de crescimento de relevância no câncer como, por exemplo, o TNF- α (MOSS *et al.*, 2001). Outro estudo realizado por Fabre-Lafay *et al.* (2005) sugeriu o papel desta ADAM no processamento da Nectina-4, um novo marcador molecular sorológico de câncer de mama. Além disso, a ADAM12 e a ADAM9 foram correlacionadas com a agressividade de tumores de fígado e correlacionadas nestes tumores com a expressão e atividade da MMP2 (metaloproteinase de matriz 2) (LE PABIC, 2003). A proteína ADAM12 também foi encontrada hiper-expressa em tumores de mama (KVEIBORG *et al.*, 2005). Como descrito, um aumento de expressão de grande parte das ADAMs mais amplamente expressas, como as ADAMs 9, 10, 12 e 17, tem sido relatado numa variedade de tumores, mas mesmo com essa evidência há pouca compreensão da possível contribuição da superexpressão das ADAMs no desenvolvimento tumoral. Quando possível, experimentos funcionais indicam que a superexpressão de certas ADAMs favorece a progressão tumoral e pode ser clinicamente significativa, em contrapartida, até o momento nenhuma mutação nos genes da família ADAM foi encontrada em correlação com tumores (ARRIBAS e BECH-SERRA, 2006).

Outro foco de estudo das proteínas ADAM no câncer é sua atividade catalítica, através da qual elas podem atuar na desregulação de vias de sinalização celular que caracterizam a progressão tumoral, como é o caso das ADAMs 10 e 17, que são capazes de clivar Notch. Notch está envolvido numa via de sinalização evolucionariamente conservada que controla a diferenciação celular e tem um papel crítico durante o desenvolvimento tumoral e angiogênese. Para a ativação de Notch é necessária a liberação do ectodomínio para que o domínio intracelular seja translocado ao núcleo onde sua interação com fatores de transcrição leva à regulação da expressão gênica (ARRIBAS e BECH-SERRA, 2006).

Outro exemplo de desregulação de vias sinalizadoras é a ativação do receptor do fator de crescimento endotelial (EGFR, também conhecido como HER). Este receptor pertence à família de receptores acoplados à tirosina quinase e induz mudanças na expressão de genes que agem coordenados para regular diferentes aspectos do comportamento celular relevantes no desenvolvimento tumoral. Os ligantes de EGFR são um vasto grupo de proteínas transmembrânicas que podem ser liberados da superfície celular pela atividade catalítica de ADAMs, principalmente ADAMs 10 e 17 que foram as mais estudadas neste contexto. Já existem

especulações acerca de inibidores da liberação dos ligantes de EGFR como tratamento anticâncer para o bloqueio da via de EGFR, entre outras especulações de usar as ADAMs como alvo de terapias contra o câncer (ARRIBAS e BECH-SERRA, 2006). A Figura 7 faz um resumo geral sobre a participação das ADAMs no câncer.

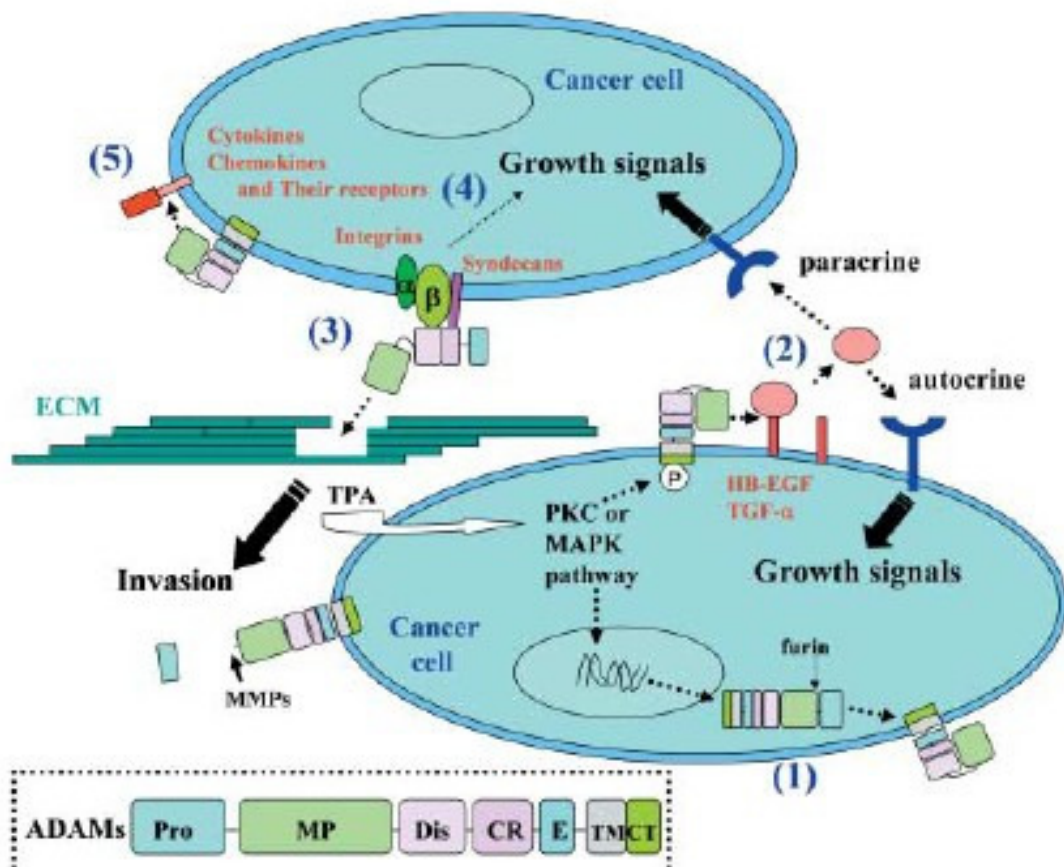


Figura 7. Uma visão geral das ADAMs na biologia do câncer.

Fonte: MOCHIZUKI e OKADA, 2007.

Legenda: Cinco diferentes vias podem estar envolvidas na mediação da proliferação celular e progressão do câncer pelas ADAMs. (1) Pro-ADAMs são ativadas por furinas ou metaloproteinases de matriz. (2) A atividade de *shed*dase das ADAMs é estimulada por fatores externos (por exemplo, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetato – TPA), levando à liberação de ligantes de superfície celular tais como fator de crescimento epidérmico ligante de heparina (HP-EGF) e TGF- α . Este processo possivelmente envolve as vias da proteína quinase C (PKC) e MAP quinase. Deste modo, fatores de crescimento solúveis como HP-EGF ativam receptores de fatores de crescimento epidérmico nas células de forma autócrina e parácrina. (3) A interação dos domínios disintegrina e domínio rico em cisteína das ADAMs com integrinas ou sindecanos nas células pode ajudá-las a clivar os substratos (ex. matriz extracelular – ECM). (4) As ADAMs modulam interações matriz extracelular-integrinas, e deste modo elas podem indiretamente promover sinais de proliferação através das integrinas. (5) As ADAMs podem processar outras moléculas indeterminadas ancoradas à membrana como as quimiocinas, citocinas e seus receptores, os quais são relacionados à proliferação celular e à progressão tumoral. CR, domínio rico em cisteína; CT, cauda citoplasmática; Dis, domínio disintegrina; E, domínio similar ao fator de crescimento epidérmico, MP, domínio metaloproteinase; Pro, domínio pro-peptídeo; TM, domínio transmembrana.

No câncer de mama, especificamente, a modulação de várias ADAMs já foi constatada. Os níveis de RNAm das ADAMs 9, 15 e 17 estão aumentados em amostras cirúrgicas de câncer de mama. *ADAM12*, que é um gene modulador de apoptose, como já dito, está superexpresso em amostras de câncer de mama, enquanto lesões não-malignas de mama expressam baixas quantidades desta metaloproteinase. A superexpressão da forma solúvel da *ADAM12* (variante de *splicing* solúvel) acelera o desenvolvimento do tumor por deter a apoptose das células tumorais. Estudos *in vitro* demonstraram que a superexpressão de *ADAM17* em células de câncer de mama aumenta suas propriedades invasoras e proliferativas. Inversamente, a inibição desta proteinase reverte o fenótipo maligno em células tumorais de mama por prevenir a liberação de TGF- α e anfiregulina. De fato, a razão entre os níveis de proteína ativa/pro-proteína aumenta do tecido de mama normal, para tumor primário de mama e para metástases linfonodais. A forma ativa da *ADAM28*, superexpressa em células tumorais de mama, contribui para a regulação da proliferação celular através da clivagem de IGFBP-3, intensificando a biodisponibilidade de IGF-1. Além dessas correlações já estipuladas entre ADAMs e câncer de mama, algumas destas proteínas poderiam servir como marcadores de resposta terapêutica. Os níveis aumentados de RNAm das ADAMs 9 e 11 em tumores estão de fato associados com melhor resposta ao tratamento com tamoxifen e a produção da proteína *ADAM9* é um indicador de mau prognóstico (ROCKS *et al.*, 2008).

Em resumo, cada vez mais evidências são encontradas sobre uma importante participação das proteínas da família ADAM nos processos de formação e progressão tumoral. Apesar disso, até o momento, poucos estudos existentes na literatura avaliam de forma sistemática o padrão de expressão gênica dos diferentes membros da família ADAM em diferentes tipos de tumores e correlacionam a expressão gênica com fatores reguladores de expressão como, por exemplo, a metilação.

No Instituto Ludwig de Pesquisa, o *Laboratory of Molecular Biology and Genomics* (LMBG) coordenado pela Dra. Anamaria A. Camargo, Co-orientadora do presente trabalho, realizou estudos da metilação do promotor do gene *ADAM23* em linhagens de tumor de mama. Verificou-se que o promotor do gene *ADAM23* está diferencialmente metilado em linhagens tumorais de cérebro e de mama. Em linhagens tumorais de mama verificou-se que 8 de 12 (66,7%) amostras

apresentaram metilação no promotor deste gene e a mesma porcentagem de metilação foi observada em tumores primários. Também foi verificado que a presença de metilação no promotor desse gene está associada com a ausência de expressão do RNA mensageiro e da proteína (COSTA *et al.*, 2004). Além disso, foi observado que tumores em estadios mais avançados apresentam um maior grau de metilação no promotor do gene ADAM23 indicando que a expressão deste gene deve estar sendo inibida durante a progressão tumoral. Outros dados ainda não publicados (trabalho submetido) indicam que o gene ADAM23 parece ser silenciado por metilação em pacientes que apresentaram metástases à distância e conseqüentemente diminuição da sobrevida livre de doença. Como Cal *et al.* (2000) verificaram que a proteína ADAM23 atua como uma molécula de adesão interagindo com a integrina $\alpha_v\beta_3$, é possível que o silenciamento deste gene esteja relacionado com alterações nas propriedades adesivas e migratórias das células tumorais.

1.7 ADAM33

O gene ADAM 33 humano foi inicialmente descrito por Yoshinaka *et al.* em 2002. Este gene está localizado no cromossomo 20p13, possui uma fase aberta de leitura de 2442 pares de base e codifica um transcrito de 22 exons, sendo a isoforma (α) mais completa (variante 1/ NM_025220) composta de 813 aminoácidos. A outra isoforma (β) presente no NCBI é a variante 2 (NM_153202) que possui 26 aminoácidos a menos que a variante 1, codificados pelo exon 17, localizado entre os domínios rico em cisteína e EGF-like. Ambas isoformas possuem todos os domínios que caracterizam os membros desta família, incluindo a seqüência consenso do sítio catalítico de ligação ao zinco (YOSHINAKA *et al.*, 2002). Além dessas duas isoformas, Powell *et al.* (2004) mostraram a existência de várias variantes de *splicing* da ADAM33 aos níveis de RNAm e proteína. Neste trabalho, foi criada a hipótese de que os vários polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) mapeados nos íntrons do gene *ADAM33* poderiam regular o *splicing* alternativo da ADAM33, o que explicaria as muitas isoformas diferentes da proteína identificadas por Western Blotting que condiziam com os mRNAs amplificados por RT-PCR.

A ADAM33 humana apresenta alta homologia (70%) com a ADAM33 de

camundongo (mADAM33), com as ADAMs 8, 12, 15 e 19 humana, e com a ADAM13 de *Xenopus laevis* (xADAM13) (YOSHINAKA *et al.*, 2002). Esta ADAM é expressa em vários tecidos adultos normais como fibroblastos pulmonares, coração, músculo liso de brônquios, no sistema nervoso central, placenta, pulmão, bexiga, veias, glândula mamária e próstata, entre outras, além de se mostrar super expressa em tecidos lesados em processo de reparo como em úlceras duodenais, o que sugere relação com resposta inflamatória (UMLAND *et al.*, 2003). A mADAM33 assim como seu ortólogo, a xADAM13 foram relacionados com o desenvolvimento embrionário, sugerindo um papel da hADAM33 na embriogênese (YOSHINAKA *et al.*, 2002).

A proteína ADAM33 contém todos os domínios característicos da família ADAM, incluindo a sequência consenso de ligação ao zinco no sítio catalítico, que é ativo nas isoformas que o contém. A proteína imatura de aproximadamente 120 kDa (quando purificada sob condições reduzidas) é processada a uma forma madura glicosilada de aproximadamente 100 kDa (isolada nas mesmas condições), cujo domínio catalítico se torna ativo através da clivagem do pró-domínio realizada por mecanismos dependentes de catálise por furinas. A proteína ADAM33 contém 5 sítios potenciais para glicosilação, sendo, 2 sítios dentro do pro-domínio, 2 sítios no domínio catalítico e um sítio no domínio disintegrina. Análises do conteúdo de oligossacarídeos da ADAM33 indicam que a proteína imatura contém oligossacarídeos híbridos. Já na proteína madura, alguns, mas talvez nem todos os oligossacarídeos são processados em formas complexas (GARLISI *et al.*, 2003). Nem todas as isoformas protéicas encontradas por Powell *et al.* (2004) se apresentam glicosiladas. Porém, uma mesma isoforma da proteína pode apresentar diferentes padrões de migração em SDS-PAGE por apresentar glicosilação diferenciada em células diferentes ou até mesmo numa única célula (GARLISI *et al.*, 2003; PROSISE *et al.*, 2004).

Quanto à localização da proteína ADAM33, pelo menos 10% dela está localizada na membrana plasmática, incluindo ambas as formas imatura e madura. O restante da proteína (~84%) produzida pela célula fica dentro do citoplasma encontrada preferencialmente no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. Existem também algumas isoformas que são secretadas (GARLISI *et al.*, 2003; POWELL *et al.*, 2004).

A presença do sítio catalítico ativo tanto em humanos como em camundongos sugere que a proteína ADAM33 tenha papel na regulação de eventos

fisiológicos e talvez patológicos (GARLISI *et al.*, 2002; YOSHINAKA *et al.*, 2002). Zou *et al.* (2004) caracterizaram bioquimicamente pela primeira vez uma atividade catalítica da ADAM33 humana. Foi demonstrado que ADAM33 está envolvida mais especificamente no processamento da proteína ligante de KIT (KL-1). O gene *KIT* é um oncogene altamente expresso em LMA (Leucemia mieloide aguda) e é ativado pela interação com seu ligante, principalmente, quando este está ancorado à membrana plasmática das células (ASHMAN, 1999).

A estrutura protéica do sítio catalítico da ADAM33 foi resolvida por cristalização e raio-X e foram demonstradas as presenças do íon Zn^{2+} , que desempenha uma função essencial na atividade catalítica da metaloproteinase, e do íon Ca^{2+} para estabilidade estrutural. A Figura 8 mostra um esquema do domínio catalítico complexado ao inibidor marimastat (ORTH *et al.*, 2004).

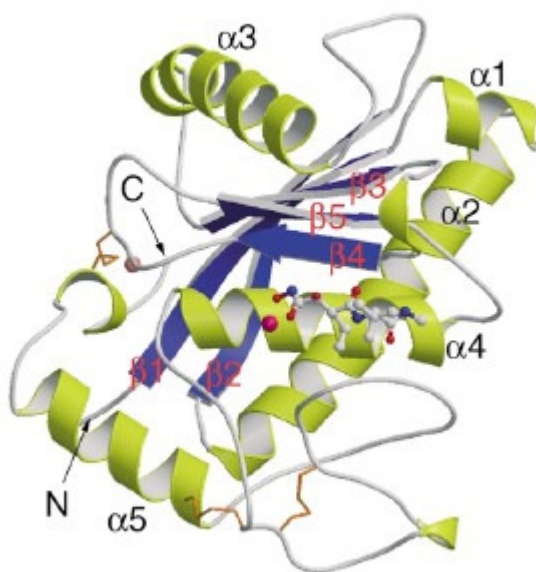


Figura 8. Estrutura do domínio catalítico da proteína ADAM33 complexada com marimastat.

Fonte: ORTH *et al.*, 2004.

Nota: Os polipeptídeos terminais estão indicados com N e C. As pontes dissulfeto estão em laranja, o íon Zinco catalítico está em pink, o íon Cálcio em rosa. O inibidor marimastat está mostrado em estrutura de bola e bastão.

Assim como outras ADAMs, a ADAM33 parece estar relacionada com adesão celular. Bridges *et al.* (2005) mostraram em um estudo com as integrinas $\alpha4\beta1$, $\alpha4\beta7$, e $\alpha9\beta1$, a interação exclusiva da ADAM33 com a integrina $\alpha9\beta1$. Esta integrina é expressa em neutrófilos (mediando eventos de adesão que facilitam a migração transendotelial destas células), em epitélio das vias aéreas, na camada

basal do epitélio escamoso, na musculatura lisa, na musculatura esquelética, em hepatócitos e monócitos (ETO *et al.*, 2002). Em camundongos *knock-out*, foi constatado que a integrina $\alpha 9\beta 1$ exerce uma função crítica na linfangiogênese, e tem como ligantes específicos tenascina, VCAM-I, osteopontina, uPAR, plasmina, angiostatina, ADAM, VEGF-C, VEGF-D (TAKADA *et al.*, 2007). ADAM33 também possui a habilidade de inibir a migração celular mediada pela integrina $\alpha 5\beta 1$ (HUANG *et al.*, 2005). Apesar da caracterização destas interações ADAM33-integrinas, são necessários mais estudos envolvendo a ADAM33 em eventos de adesão para esclarecer seu papel nestes processos.

Diferentes polimorfismos no gene *ADAM33* estão significativamente associados com a suscetibilidade ao desenvolvimento de asma e à hiperresponsividade dos brônquios em diferentes etnias. Vários polimorfismos em um único nucleotídeo (SNPs) foram encontrados e afetam tanto regiões não traduzidas, como regiões codificantes para os diferentes domínios da proteína. Apenas um SNP afetando a seqüência de aminoácido foi localizado no sítio catalítico e pode supostamente afetar a ligação ao substrato e subseqüentemente afetar os parâmetros enzimáticos da molécula. Outro SNP que pode estar afetando a atividade enzimática da ADAM33 está localizado no pró-domínio e deve afetar a ativação do sítio catalítico (VAN EERDEWEGH *et al.*, 2002; CHAE, 2003; ORTH *et al.*, 2004).

Os SNPs localizados nos introns e na região 3' não traduzida parecem afetar o *splicing* alternativo, a eficiência do *splicing* e o *turnover* do mRNA. Foi sugerido que a aparente importância deste gene nas patologias associadas à asma está relacionada com alguns polimorfismos que devem acelerar a proliferação das células musculares, dos fibroblastos e dos miofibroblastos, e subseqüentemente devem induzir as mudanças no remodelamento das vias aéreas do pulmão de pacientes asmáticos. Estas suposições são suportadas pelo perfil de expressão celular assim como pelo perfil de expressão protéico da ADAM33 nos tecidos relacionados (CHENG *et al.*, 2004).

Foi sugerido que a ADAM33 afete os processos de asma tendo um papel na alteração da expressão de fatores de crescimento, na regulação da clivagem proteolítica de citocinas, ou estar relacionada com a resposta imune mediada por células Th2 (SHAPIRO e OWEN, 2002). Martin e Jo (2008) discutem que pela ADAM33 ser uma proteína de superfície celular que medeia adesão e sinalização

celular, sua relevância deve ser maior para o remodelamento do que para funções contráteis. Sendo assim, é possível que a ADAM33 esteja envolvida no remodelamento da musculatura lisa dirigido por alérgenos, hipótese que precisaria de um modelo mais crônico para ser demonstrada (MARTIN e JO, 2008). Todas estas suposições sobre o papel da ADAM33 na patofisiologia da asma precisam ser elucidadas, inclusive o mecanismo pelo qual os SNPs estão associados com a doença, desregulando a função protéica. Neste contexto, Del Mastro *et al.* (2007) estudaram o SNP BC+1, que é um dos mais associados com asma, localizado na região 5' dentro do íntron BC, onde estão localizadas também seqüências não codificadoras que contém elementos regulatórios da transcrição. Neste trabalho, Del Mastro *et al.* (2007) provaram que o sítio polimórfico BC+1 do gene é capaz de suprimir a transcrição de um gene repórter *in vitro*, o que, *in vivo*, pode significar uma regulação de *splicing* alternativo. Powell *et al.* (2004) sugeriram o envolvimento dos SNPs no *splicing* alternativo do RNAm do gene ADAM33 e encontraram diversos transcritos e proteínas diferentes em culturas primárias de fibroblastos das vias aéreas de pacientes asmáticos. Todas estas isoformas da ADAM33, tanto ao nível de RNAm quanto ao nível protéico, foram encontradas por Haitchi *et al.* (2005) em todos os grupos estudados (vias aéreas normais, asmáticas e embriônicas) sem diferenças significativas. Porém, num trabalho mais recente sobre a expressão de ADAM33 correlacionada com a severidade da doença, Foley *et al.* (2007) encontraram uma expressão significativamente aumentada ao nível de RNAm em asma moderada e asma severa, comparativamente com asma branda e controles. A diferença de resultados poderia ser explicada pela escolha das amostras diferenciando os pacientes asmáticos em 3 grupos, asma branda, moderada e severa (FOLEY *et al.*, 2007).

Em outro trabalho envolvendo expressão do gene ADAM33, foi feita uma investigação da relação entre a expressão deste gene em células de musculatura lisa de vias aéreas e o microambiente de inflamação alérgica, de onde foi demonstrada a regulação negativa da expressão de ADAM33 isoformas α e β por INF- γ ao nível transcricional. INF- γ está envolvido com o reparo das células epiteliais dos brônquios, apesar de sua expressão ser baixa em asma. Porém, pacientes em terapia de corticosteróides apresentam aumento de células positivas para INF- γ . Este achado sugere que a anormalidade na migração e proliferação de ASM cells

proposta no remodelamento das vias aéreas pode ser parcialmente um resultado da perda do efeito inibitório de $\text{INF-}\gamma$ sobre a ADAM33 (ITO *et al.*, 2007).

Apesar de todos os trabalhos já publicados sobre o envolvimento da ADAM33 com asma, Chen *et al.* (2006) não encontraram nenhum aspecto fenotípico da asma afetado significativamente pela perda do gene *ADAM33* em camundongos *knock-out*, incluindo hiperresponsividade das vias aéreas, após sensibilização com alérgenos e desafio com acetilcolina. Além disso, esses camundongos nasceram e se desenvolveram normalmente e não apresentaram infertilidade nem anormalidades morfológicas em nenhum órgão até os 8 meses de idade, ou seja, ADAM33 não é essencial para o crescimento e desenvolvimento, nem modula asma alérgica em camundongos (CHEN *et al.*, 2006).

Recentemente, um estudo demonstrou o envolvimento de SNPs no gene *ADAM33* com psoríase, uma doença crônica inflamatória e hiperproliferativa da pele (LESUEUR *et al.*, 2007). O mesmo grupo havia confirmado anteriormente a presença de um locus de susceptibilidade à psoríase no cromossomo 20p13 em famílias francesas (LESUEUR *et al.*, 2007 *apud* LESUEUR *et al.*, 2007). No trabalho mais recente, foi dada continuidade ao estudo anterior efetuando o mapeamento fino da região de 17Mb usando um estudo de caso baseado em família, onde eles descreveram a identificação do gene *ADAM33* como um novo gene de susceptibilidade à psoríase (LESUEUR *et al.*, 2007). Esses achados podem ser uma fonte de informações importantes para a compreensão do papel fisiológico da proteína ADAM33, sendo que vários SNPs têm sido encontrados em associação com asma e hiper-responsividade dos brônquios em Caucasianos, em afro-americanos e hispânicos, ressaltando que também já foi relatada correlação entre SNPs no gene *ADAM33* e rinite alérgica em população japonesa devido ao pólen do cedro japonês (CHENG *et al.*, 2004). Este primeiro relato de associação entre ADAM33 e psoríase confirma que vias biológicas comuns podem estar envolvidas na etiologia da psoríase e outras doenças imunes clinicamente distintas (LESUEUR *et al.*, 2007).

ADAM33 foi recentemente descrito e muitos estudos visam verificar a existência de polimorfismos neste gene e sua correlação com processos asmáticos, porém pouco se sabe sobre sua atividade no desenvolvimento e na progressão tumoral. Até o momento, o único estudo que correlaciona o gene *ADAM33* com câncer é o de Schwartzbaum *et al.* (2005) que mostra uma relação inversa entre os

polimorfismos associados com asma e o glioblastoma multiforme.

O presente trabalho parece ser o primeiro estudo que visa, entre outros objetivos correlacionar os achados de diminuição de expressão de *ADAM33* em linhagens de tumor de mama e sua regulação da expressão gênica, via metilação, com a progressão tumoral em câncer de mama. O interesse para se estudar esse gene veio da publicação de Costa *et al.* (2004) com o gene *ADAM23*. Como foi constatada a importância desse gene em câncer de mama foi feito um vasto estudo em todos os membros da família ADAM que tinham ilhas de CpG na região promotora. Entre eles destacou-se o estudo de Ierardi (2005) com o gene *ADAM33* em sua tese de doutorado. Como ficaram em aberto várias dúvidas quanto ao seu papel na tumorigênese do câncer de mama, este trabalho teve como objetivos a continuidade detalhada do estudo do gene *ADAM33* e a correlação da regulação da sua expressão por metilação e o câncer de mama.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a participação da metilação no controle da expressão do gene *ADAM33* em linhagens tumorais de mama para posterior correlação dos achados de metilação em tumores primários com aspectos clínico-patológicos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar através de RT-PCR o padrão de expressão gênica de *ADAM33* em linhagens tumorais ainda não testadas (em trabalho anterior) e linhagem normal de mama
- Clonar e seqüenciar as Ilhas de CpG da região promotora identificando os dinucleotídeos CG metilados e não metilados em todas as linhagens de estudo.
- Correlacionar o padrão de metilação de uma ilha de CpG com o padrão de expressão gênica encontrado nas linhagens tumorais e linhagem normal .
- Projetar iniciadores para utilizar a técnica de MSP (Methylation Specific PCR) para estudar o padrão de metilação do gene *ADAM33* diferencialmente expresso em amostras de tumores primários de mama provenientes do Banco de Tumores do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do departamento de Genética do setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.
- Correlacionar os dados de metilação das amostras tumorais com os dados clínico-patológicos das pacientes a fim de avaliar o envolvimento deste gene nos processos de formação e progressão tumoral em mama.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O material biológico utilizado no estudo foram linhagens celulares humanas de tumor de mama cedidas pelo Instituto Ludwig de Pesquisa para o Câncer em São Paulo: MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-436, MCF7, SK-BR-3, PMC42, HB4a, que é uma linhagem celular normal de mama imortalizada por vírus SV40 (STAMPS *et al.*, 1994), HB4a C3.6, que é uma linhagem HB4a modificada que superexpressa *ERBB2* (HARRIS *et al.*, 1999) e a linhagem ZR-75-31 adquirida do Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). A utilização do painel de células se justifica do ponto de vista metodológico pela disponibilidade de grandes quantidades de material, assim como pela ausência de contaminação com células normais. Do ponto de vista teórico, o estudo da metilação diferencial nessas linhagens foi amparado por um conhecimento já bem consolidado pelo grupo do Instituto Ludwig em São Paulo.

Foram utilizadas 76 amostras de tumores primários de mama, provenientes de pacientes do sexo feminino, caucasóides, não aparentados e com idade média igual a $58,1 \pm 14,78$ anos. Das 76 pacientes 51 eram portadoras de carcinomas ductais invasivos, 1 de carcinoma ductal "in situ", 21 de carcinomas lobulares invasivos e 3 pacientes portadoras de fibroadenomas (amostras ausentes de malignidade utilizadas como controle negativo). As amostras tumorais foram gentilmente cedidas pela Dra. Enilze S. F. Ribeiro e pelo Dr. Iglenir João Cavalli, responsáveis pelo Banco de Tumores do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Todas as amostras catalogadas neste Banco de Tumores foram obtidas mediante consentimento informado dos pacientes (ANEXO 2) e aprovação do Comitê de Ética, Processo nº 25000.007020/2003-93; registro no CONEP: 7220 e parecer nº 251/2003, de 20/02/2003 do Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba-PR (proveniência das amostras sob responsabilidade do Dr. Rubens Silveira Lima).

3.2 CULTIVO DE CÉLULAS

Os cultivos das linhagens foram realizados em meio RPMI1640 (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% e antibióticos, garamicina (40 µg/mL) para evitar contaminação bacteriana, ciprofloxacina (10 µg/mL) para evitar contaminação por espécies do gênero *Mycoplasma*, anfotericina B (2,5 µg/mL) para evitar contaminação por fungos e leveduras. Algumas linhagens receberam suplementação de hormônios como insulina (5 µg/mL) para as linhagens HB4a, MDA-MB-435, MDA-MB-436, PMC42 e HB4a C3.6, e hidrocortisona (100 µg/mL) no caso das linhagens HB4a, HB4aC3.6 e PMC42. As amostras contendo aproximadamente 10^6 células foram retiradas do nitrogênio líquido, descongeladas a 37 °C e repassadas dos tubos criogênicos para uma garrafa pequena (24 cm³) contendo aproximadamente 4 mL de meio de cultura e acondicionadas na estufa com tensão de CO₂ a 5%. O meio de cultura foi regularmente trocado dependendo da necessidade ou em dias alternados.

A confluência de aproximadamente 90% das células foi o indicativo para expansão da garrafa pequena para a média (80 cm³). Neste processo, as células foram tratadas com TrypLE™ Express (Gibco), em quantidade suficiente para cobrir a superfície da garrafa onde as células estavam aderidas e incubadas por 3 a 5 minutos em estufa a 37 °C, depois deste tempo foi adicionado o dobro de meio de cultura completo para inativação da tripsina. As células soltas foram então centrifugadas a 700 x g, o meio com tripsina foi descartado, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 novo e completo, transferidas para a nova garrafa e levadas à estufa de CO₂.

3.3 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE *ADAM33* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA

A expressão do gene e da proteína ADAM33 foi avaliada pelas técnicas de RT-PCR e Western Blotting descritas a seguir.

3.3.1 Extração de RNA

O RNA total foi isolado de um número aproximado de 4×10^6 células utilizando *TRIzol Reagent* (Life Technologies, USA), segundo especificações do fabricante. A extração do RNA utilizando esse reagente é uma adaptação do método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987). O método consiste de lavagem inicial das células na garrafa com PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4), adição de *TRIzol Reagent* suficiente para cobrir a superfície da garrafa onde as células estão aderidas e incubação (para lise e dissolução dos componentes celulares mantendo a integridade do RNA). O lisado de células é então distribuído em alíquotas de 1 mL para tubos contendo 250 μL de clorofórmio para a extração do RNA total por inversão vigorosa dos tubos. Após centrifugação a 4 °C e 8100 x g por 20 minutos para separação das fases, é feita a coleta da fase aquosa para um novo tubo. O RNA total é precipitado com 500 μL de isopropanol por incubação a -20 °C por cerca de 18 horas. No dia seguinte, o RNA é submetido à centrifugação por 5200 x g por 10 minutos e em seguida lavado com etanol 75%, seco ao ar e solubilizado em água tratada com DEPC 0,1% (Gibco). Todo procedimento com RNA foi realizado em câmara de fluxo laminar com uso de luvas, touca e máscara. Todo material utilizado foi autoclavado duas vezes para inibir a atividade residual de RNases. O material para eletroforese foi tratado preventivamente como recomendado (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

A quantificação do RNA total extraído foi feita em espectrofotômetro com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando-se que 1 $\text{DO}_{260\text{nm}}$ equivale a 40 $\mu\text{g/mL}$ de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas. O valor ideal dessa relação deve estar contido na faixa de 1,8 a 2,0. A integridade dos RNAs extraídos foi verificada aplicando-se 1 μg de RNA total em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo 0,2 $\mu\text{g/mL}$. Antes de ser aplicado, o RNA foi preparado com tampão de amostra desnaturante contendo uréia (7M uréia e 30% glicerol). Todos os procedimentos foram realizados com material para uso exclusivo de RNA. Assim sendo, foram considerados íntegros os RNAs que apresentaram as bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S bem evidentes, tendo a primeira o dobro da intensidade da segunda.

3.3.2 Obtenção da primeira fita de cDNA

Aproximadamente 500 ng de RNA total foram transcritos reversamente à primeira fita de cDNA na presença de 200 U da enzima transcriptase reversa (Superscript II, Gibco BRL), utilizando 25 pmoles do iniciador OLIGO dT em uma reação com volume final de 20 µL contendo solução tampão 1X, 25 U de inibidor de Rnase (Promega) e 200 µM de dNTPs. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a 65 °C por 5 minutos para abertura de possíveis estruturas secundárias. A reação de síntese de cDNA foi realizada a 42 °C por 60 minutos e a 72 °C por 15 minutos.

O gene de expressão constitutiva *GAPDH* foi utilizado como controle para analisar a eficiência de síntese e qualidade do cDNA nas amostras. Para isso, os iniciadores foram planejados entre os exons 7 e 8. Deste modo uma eventual contaminação com DNA genômico seria detectada pela presença de uma banda de massa molecular correspondendo aos exóons e íntrons intercalados. Uma alíquota de 1 µL do cDNA foi utilizada em reação de RT-PCR com volume final de 20 µL contendo 1X tampão de PCR (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 1U *Taq* Platinum (Invitrogen) e 8 pmoles de iniciadores específicos. As condições de amplificação do gene de expressão constitutiva *GAPDH* foram: desnaturação do cDNA por 5 minutos a 94°C e em seguida 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento a 63°C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Ao final da ciclagem as moléculas foram extendidas por 5 minutos a 72 °C. As seqüências dos iniciadores utilizados para o gene de expressão constitutiva *GAPDH* foram: GAPDH F 5` CTG CAC CAC CAA CTG CTT A 3` e GAPDH R 5` CAT GAC GGC AGG TCA GGT C 3`.

3.3.3 RT- PCR do gene *ADAM33*

Iniciadores específicos para o gene *ADAM33* foram desenhados na região 3' da molécula de RNAm e foram utilizados em reações de RT-PCR para avaliar o padrão de expressão gênica. Os iniciadores foram desenhados com o auxílio do programa Oligotech e posicionados nos éxons 19 e 22. As seqüências dos

iniciadores usados foram RTP331F 5' CAT GAC ACC TTC ATG CTG 3' e RTP331R 5' ATC TTG GCA TCT GGA CTT G 3', o fragmento amplificado por estes iniciadores tem 299 pares de bases. As reações foram realizadas em um volume final de 20 µL contendo 1 µL de cDNA, 1X tampão de PCR (Invitrogen), 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 1 U *Taq* Platinum (Invitrogen) e 8 pmoles dos iniciadores específicos. As condições da reação foram: desnaturação por 10 minutos a 95 °C e em seguida 38 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, anelamento 60 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Ao final, as moléculas foram submetidas a mais 5 minutos de extensão a 72 °C.

3.3.4 Eletroforese em Géis de Poliacrilamida 8%

Os produtos das reações de RT-PCR foram analisados em gel de poliacrilamida. Os géis de poliacrilamida 8% foram feitos utilizando-se uma solução de acrilamida e bis-acrilamida na proporção 29:1, TEMED a 0,1% (Life Technologies) como doador de elétrons da reação e persulfato de amônio (APS) a 0,1% como catalisador da reação. As eletroforeses foram conduzidas em aparato de gel médio a 100 V por aproximadamente 1 hora. A revelação dos resultados foi feita pela impregnação com nitrato de prata segundo o método de Sanguinetti *et al.* (1994). Para revelar, cada gel de aproximadamente 56 cm² foi incubado por 10 minutos em 50 mL de solução fixadora (0,75% de ácido acético glacial, 10% de etanol absoluto), sob agitação, à temperatura ambiente. A esta solução foi adicionado 1 mL de nitrato de prata (10%) e o gel incubado por mais 10 minutos. Após impregnação do DNA com prata, o fixador foi desprezado e o gel foi lavado com água filtrada em Millipore. Para revelação, foi adicionado 50 mL de solução de hidróxido de sódio 3% e 0,7 mL de formaldeído 37% e incubado sob agitação até o aparecimento de uma coloração castanho escura do DNA impregnado. Após a revelação, o gel foi incubado em 50 mL de solução fixadora por 10 minutos, lavado com água ultrapura e a seguir seco em papel celofane.

3.3.5 Extração de Proteínas

O extrato de proteínas foi feito a partir de 3 garrafas médias em confluência total das células. Primeiramente cada garrafa foi lavada 2 vezes com PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) para retirar o máximo possível de soro fetal bovino, as células então foram soltas com o auxílio de raspador e centrifugadas a 700 x g para fazer um *pellet* único das 3 garrafas. Ao *pellet* foram adicionados 200 µL de tampão de lise (0,2% deoxicolato de sódio, 0,5% Triton X 100 e 50 mM Tris HCl pH 7,4) e os inibidores de proteases PMSF 1mM, fenantrolina 10 mM, NEM 1mM e Iodoacetamida 10 mM. O material em lise foi incubado no gelo por 40 minutos. Durante a incubação a lise das células foi auxiliada pela aspiração repetitiva em seringa contendo agulha de calibre 12,7 X 0,33 mm. O extrato foi clarificado por centrifugação a 4 °C por 18 minutos a 13700 x g e o sobrenadante foi guardado a -20 °C. A qualidade das proteínas foi verificada por eletroforese em gel de poliacrilamida 10% corado com Coomassie[®] Brilliant Blue R (Sigma) e a quantificação das proteínas totais foi feita pelo método de BRADFORD (1976).

3.3.6 Western Blotting

Aproximadamente 100 µg de proteínas totais de cada linhagem (HB4a – controle positivo, MDA-MB-231, MDA-MB-435 não expressam ADAM33) foram reduzidos com tampão redutor 1X (50 mM TrisHCl pH 6,8, 200 mM β-mercaptoetanol, 2% SDS, 0,1% azul de bromofenol, 10% glicerol), desnaturados pelo calor e resolvidos por SDS PAGE em gel de poliacrilamida 7,5% (LAEMLI *et al.*, 1970). Como marcador de massa molecular foi usado Rainbow Markers Senscience RPN 756. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de decafluoreto de polivinil (PVDF) em sistema submerso contendo tampão de transferência (25 mM Tris HCl, 192 mM Glicina, 20% metanol, 0,037% SDS) por 1 hora a 100 volts. Para a imunodeteção, a membrana foi bloqueada por 2 horas com leite mólico desnatado 5% dissolvido em TBS-Tween 0,1% (137 mM HCl, 2,7 mM KCl, 24,8 mM Tris HCl, 0,1% Tween). Após esse período, a membrana foi incubada por cerca de 18 horas a 4 °C com anticorpo policlonal Anti-ADAM33 (Sigma) de

concentração 1mg/mL numa diluição de 1:1000. O anticorpo primário foi retirado por 3 lavagens sucessivas com TBS-Tween 0,1%. O anticorpo secundário foi o Anti-rabbit HRP (Sigma) de concentração 1 mg/mL diluído 4000 vezes. Depois de 3 lavagens com TBS-T 0,1%, a membrana contendo a reação antígeno-anticorpo foi revelada com Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate HRP (Pierce) e detectado por exposição a filme radiográfico Kodak. Para normalização, a membrana foi tratada com hidróxido de sódio 1M para retirada dos anticorpos e usada novamente para reagir com o anticorpo contra a proteína de expressão constitutiva Anti-Hsp70 (Stressgene) de concentração 1 mg/mL diluído 1000 vezes, usando as mesmas condições anteriores e revelada com anticorpo secundário Anti-mouse HRP (Sigma) 1 mg/mL em diluição de 1: 4000.

3.3.7 Tratamento das Linhagens Tumorais com o Agente Desmetilante 5-Aza-2'-Deoxicitidina

Para confirmar o papel da metilação na regulação da expressão do gene *ADAM33*, as linhagens MDA-MB-435, MDA-MB-231, MDA-MB-436 e ZR-75-31, que apresentaram resultado negativo no RT-PCR, foram tratadas com o agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina. Uma quantidade de 10^6 células foi adicionada a uma garrafa pequena e cultivada por 48 horas. Após este período as linhagens foram tratadas com 1 μ M do agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina. Após um período de 6 dias de tratamento, as células foram lavadas com PBS1X e o RNA total foi extraído da mesma forma descrita no item 4.3.1.

A partir do RNA obtido das linhagens tratadas, o cDNA foi sintetizado e reações de RT-PCR para *ADAM33* foram realizadas conforme descrito no item 4.3.3. Os produtos foram visualizados em gel de poliacrilamida 8% conforme descrito no item 4.3.4.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE *ADAM33* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA

Para a caracterização do perfil de metilação do promotor do gene *ADAM33*

foi preciso: identificar e localizar ilha(s) de CpG na região promotora, planejar iniciadores flanqueando essa região para clonagem utilizando PCR *nested*, clonar os fragmentos correspondentes à ilha de CpG obtida por PCR das diferentes linhagens normal e tumorais em vetor de seqüenciamento e, por fim, seqüenciar e analisar a região de estudo.

3.4.1 Identificação das Ilhas de CpG do gene *ADAM33*

A localização do gene *ADAM33* no genoma humano foi feita através do BLAST N contra o Nr e/ou HTGS do NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2006). O nucleotídeo inicial foi determinado de acordo com o definido pelos autores e a partir deste foi delimitada uma seqüência de DNA de aproximadamente 2 kb anteriores e 1kb posterior à região 5' UTR (ou região promotora do gene de estudo). Com esta seqüência, a presença de ilhas de CpG foi verificada através da ferramenta CpGplot disponível na página do grupo EMBL (EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE – EBI, 2006). Esta análise segue os parâmetros estipulados pelo CpGplot que são os parâmetros que definem uma Ilha de CpG descritos em 1987 por Gardiner-Garden e Fromer.

3.4.2 Desenho dos iniciadores

Foram desenhados dois pares de iniciadores para amplificação de cada uma das duas ilhas de CpG encontradas. A Figura 9 mostra um esquema da região promotora do gene *ADAM33* e a localização dos iniciadores desenhados para cada ilha estudada.

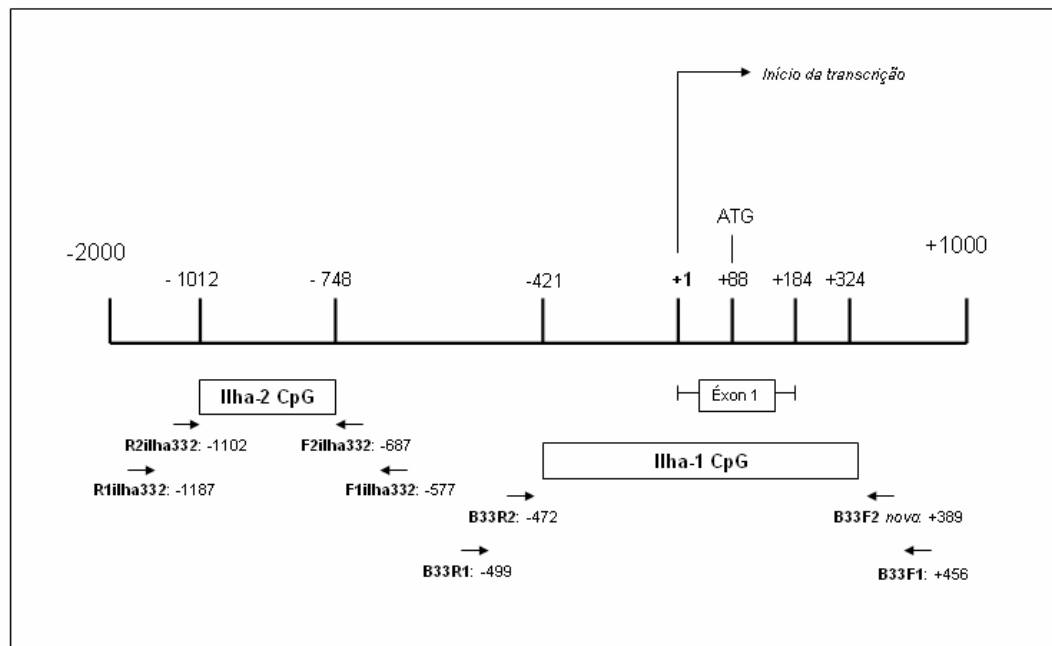


Figura 9. Esquema de um fragmento de 2000 pares de base da região promotora e 1000 pares de base do início da região codificante do gene *ADAM33*.

Nota: As setas indicam a posição dos iniciadores usados para amplificar as ilhas de CpG por PCR *nested*. Observação: o esquema não está representado em escala.

Para amplificar regiões promotoras ou seqüências de DNA tratadas com bissulfito de sódio (técnica descrita e explicada a seguir no tópico 4.4.4), nas quais se deseja verificar o padrão e a distribuição da metilação, os iniciadores desenhados não devem conter nenhum dinucleotídeo CpG. Essa característica é importante para que a reação de PCR seja capaz de amplificar a região em estudo, tanto em amostras altamente metiladas, quanto em amostras desmetiladas. Por causa do tratamento com bissulfito que faz a desmetilação do DNA, na seqüência do iniciador *Forward* (F) todas as citosinas são convertidas em timina e na seqüência dos iniciadores *Reverse* (R) todas as guaninas são convertidas em adenina. Para tanto, utilizamos um programa disponível na internet chamado de Methprimer (2006) para auxiliar no desenho dos iniciadores.

A Ilha-1 de CpG do gene *ADAM33* possui 742 pb e está localizada entre os nucleotídeos - 421 e + 324. As regiões utilizadas para o desenho dos iniciadores, cujo fragmento amplificado possui 861 pb (localizado entre os nucleotídeos - 472 e + 389), estão mostradas na figura 10, no formato dado pelo programa Methprimer, que converte o DNA normal ao DNA tratado com Bissulfito de Sódio (fita alinhada abaixo). O gene *ADAM33* tem o início de transcrição na fita menos, portanto para facilitar o entendimento apresentamos a região promotora do gene na posição 5'

para 3'. Nesse formato não é possível alinhar os iniciadores porque eles foram planejados na fita mais.

```

901 TGCTGCATCGCCTTTGCCCAGCAATGAAGCCCCAAGACAGCGGCAGCCGGTTGCCTGAA
   ||::||:|++::|||::||:|||||:::||||:|++|:|:++|||::|||
901 TGTGTATCGTTTTTGTTAGTAATGAAGTTTTTAAGATAGCGGTAGTCGGTTGTTTGAA

961 CCTTCCTATCCTTGGGGGCACCCAGTGCAGGTGGATGACC CGACTCAACCTC CGCCAGGG
   ::||::|||::|||::|||::|||::|||::|||::|||::++|:|:|:|:|:++::|||
961 TTTTTTTTATTTTTGGGGTATTTTAGTGTAGGTGGATGATT CGATTTAATTTT CGTTAGGG

1021 CACCCTCGGGGCAGGACCGGGTAGCAAGGAGGGGACAGAGATCGGCCCCAGGAGACCACGG
   :|:::|++|||:||||++| |||:|||||:|||||++|:|:|:|:|:|:|++|
1021 TATTTTCGGGTAGGACCGGGTAGTAAGGAGGGGATAGAGATCGGTTTTAGGAGATTACGG

1081 AAGATCGCGCTCCTGGGGCCAACTTCAGCAGCGAGAGGCGGCCTTTGCCACCGCCTCAT
   ||||++++:|:||||:|:|:|:|++| |||++|:|:|:|:|:++::|:|
1081 AAGATCGCGTTTTTGGGGTTAATTTTAGTAGCGAGAGGCGGTTTTTGTATTATCGTTTTAT

1141 CCCACCACGCGCGCTCCTCCAAGAACCTTCCCAGCGGTTCTCTCCTCTCAGGAGTA
   ::|:|:|++:+++:|:|:|:|:|:|:|++| |:|:|:|:|:|:|:|:|
1141 TTTATTAAGTCGCGGTTTTTTAAGAAATTTTTTAGCGGTTTTTTTTTTTTTTAGGAGTA

1201 GAGGCCCTCTGAGACCGACGGGGAGGGA CGGCTCGGCGCGGTCATCCGAGGGGCCCGCACG
   ||||:::|:||||:++|++| ||| |||++|:|++|:|:|++| |||:++:|++
1201 GAGGTTTTTTTGTAGATCGACGGGGAGGGA CGGTT CGGGT CGGTTATT CGAGGGGT CGTAGCG

1261 GATTCCCTCCTCGCCAGCTCCACCCCTCGAGGGGCGGCGGTC CGGGAGTGGCGACCC
   ||||:::|:|:|++::|:|:|:|:|++| |||++|++|:|++| ||| |||++|:|+
1261 GATTTTTTTTTTCTTTAGTTTTATTTTTTCGAGGGGCGGCGGTT CGGGAGTGGCGATTCT

1321 CGCTCCCCCATGGCGCGCGCTCGGGGCCCTGGCCAGGCTCCGAGCGGGGTTGGCGGG
   +|:|:|:|:| |||+++++:++|++| |||:|:|:|:|:|++|++| ||| |||++|
1321 CGTTTTTTTTTATGGCGCGCGCTCGT CGGGGTTTTTGGTTAGGTTTCGAGCGGGGTTGGCGGG

1381 GAGGGGAGGCGGGAGCGAGGGCGGGCGGTGGGAGGTGGGGGCGGGAAGGTCGAAGGCGG
   ||| |||++| |||++| |||++|++| ||| |||++| |||:++| |||++|
1381 GAGGGGAGGCGGGAGCGAGGGCGGGCGGTGGGAGGTGGGGGCGGGAAGGTTCAAGGCGG

+1
1441 CGGCCTGAGGCTGCACCGGGCA CGGGT CGGC CGCAATCCAGCCTGGGCGGAGCCGGAGTT
   ++|:|:| |||:|:|:++| |:|++| |||++|:++| |:|:|:|:| |||++| |:|++| |||
1441 CGGTTTGAGGTTGTATCGGGTACCGGGT CGGT CGTAATTTAGTTTGGGCGGAGTCGGAGTT

1501 GCGAGCCGCTGCCTAGAGGCGGAGGAGCTCACAGCTATGGGCTGGAGGCCCGGAGAGCT
   |++| |:++| |:|:| |||:++| |||:|:|:|:|:| ||| |:++| ||| |:|
1501 GCGAGTCGTTGTTTAGAGGT CGAGGAGTTTATAGTTATGGGTTGGAGGTTTCGGAGAGTT

1561 CGGGGGACCCCGTTGCTGCTGCTGCTACTACTGCTGCTGCTCTGGCCAGTGCCAGGCGCC
   ++| ||| |:++| |:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|++::+
1561 CGGGGGATTTCTGTTGTTGTTGTTATTATTGTTGTTGTTTGGTTAGTGTTAGGCGTCT

1621 GGGGTGCTTCAAGGTGAGGACGCGGGCGGGGTGCGCCCTGAGGGGCAGGCTAGGCGCGGT
   +| |||:|:|:| ||| |||+++:|++| |||++::| ||| |:|:| |||+++:|
1621 GGGGTGTTTTAAGGTGAGGACGCGGGCGGGGTGCGTTTTGAGGGGTAGGTTAGGCGCGGT

1681 GGTGGTGGCGGGATGGGTTCTGCTCAGAGCTCGGGTCAGCGCGCGAGGGTCTCACGGC
   ||| |||++| ||| |||:|:|:|:|:|++| |:|+++:| ||| |:|:|++|:
1681 GGTGGTGGCGGGATGGGTTTTGTTTAGAGTT CGGGTTAGCGCGCGGAGGGTTTTACGGT

```



```

1741 CC CG GCACCATA CG GCCAGTAGGTCAGGG CG TG GGGACTCTTTGGGGGGGTCTC CG TGGG
    : : + + | : : : | | + + | : : | | | | | : | | | | + + | | | | : : | | | | | | : : + + | | |
1741 TT CG GTATTATA CG GTTAGTAGGTTAGGG CG TG GGGATTTTTTGGGGGGGTTTT CG TGGG

1801 ACCTGCCCAGGGA CG CTCAAGTGTGCTTGGGCTGGCCC CG GGCC CG GACTTGCCACACT
    | : : | | : : | | | | + + : | : | | | | | : | | | | : | | : : + + | | : + + | | : | | : : : | : |
1801 ATTTGTTTAGGGA CG TTAAGTGTGTTTGGGTGGTTT CG GGTT CG GATTGTTTATATT

1861 GCC CG GCTGCCACTC CG CTGGCAAAGCAGAGGGCATGGCTCCCTCCCCCT CG GGGGCAGC
    | : : + + | : | : : | : : + + | | : | | | | : | | | | : | | : : : : + + | | | : | : |
1861 GTT CG GTTGTTATTT CG TTGGTAAAGTAGAGGTATGGTTTTTTTT TTTTT CG GGGGTAGT

```

Figura 10. Seqüência de DNA de um fragmento da região 5' do gene ADAM 33 contendo a ilha-1 de CpG.

Nota: A ilha-1 de CpG está destacada em amarelo. As regiões destacadas coloridas correspondem às posições dos iniciadores desenhados, cujas seqüências são **B33F1**: 5' AGG GAG TTA TGT TTT TTG TTT TGT TAG 3', **B33R1**: 5' ATT ACC TAA ACC TTC CTA TCC TTA 3', **B33F2**: 5' GGG TTA GTT TAA GTA TAT TTG AG 3', **B33R2**: 5' ACA CCC AAT ACA AAT AAA TAA CC 3'. Em vermelho estão os dinucleotídeos CpG. : significa conversão de C para T pelo bissulfito de sódio. Está destacado na posição 1450 o início de transcrição (+1) e em cinza o ATG.

A ilha-2 de CpG da região promotora do gene *ADAM33* está localizada entre os nucleotídeos -1012 e -748 e o fragmento de 415 pares de base a ser amplificado por PCR *Nested* está localizado na região entre os nucleotídeos -1102 e -687 (FIGURA 11).

```

241 AAATTAGCCAGG CG TGGTGG CG AATGCCTGTAATCCCAGCTACT CG GGAGGCTGAGGCAG
    | | | | | : : | | + + | | | | + + | | | : : | | | | : : | | : + + | | | | : | | | : |
241 AAATTAGTTAGG CG TGGTGG CG AATGTTTGTAAATTTTAGTTATT CG GGAGGTTGAGGTAG

301 AAGAATCACTTGAATCTGGGAGGCAGAGGTTGCAGTGAGCCCAGATCATGCCATTGCACT
    | | | | | : : | | | | : | | | | : | | | | : | | | | : : | | | : | | | : |
301 AAGAATTATTTGAATTTGGGAGGTAGAGGTTGTAGTGAGTTTAGATTAT TGTATTGTATT

361 CCAGTCTGGGTAACAAGAGAGAACTCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGATTT
    : : | | | : | | | | | : | : | | : | | | | | | | | | | | | | | | |
361 TTAGTTTG GGTAAATAAGAGAGAAATTTGTTTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGATTT

421 GCTTAAAAGTTAACATCTC CG GC CG GG CG CG GTGGCTCATGCCTGTAATCCCAG CG CTTT
    | : | | | | | | | : | : | : + + | : + + | + + + + | | : : | | : : | | | | : : | + + : | |
421 GTTTAAAAGTTAATATTTT CG GT CG GG CG CG GTGGTTTATGTTTGTAAATTTTAG CG TTTT

481 GAGAGGCC CG AGG CG GGTGGATCA CG AGATCAGGAGATTGAGACCATCCTGGCCAAAATGG
    | | | | : + + | | + + | | | | : | + + | | : | | | | | | | : : | : : | | : | | | |
481 GAGAGGT CG AGG CG GGTGGATTA CG AGATTAGGAGATTGAGATTATTTTGGTTAAAATGG

541 TGAAACCT CG TCTCTGCTAAAAATACAAAAGTTAGCTGGGGGTGGTAG CG CG CG CCTGTA
    | | | | : : + + | : : | : | | | | | : | | | | | | | | + + + + + : : | | |
541 TGAAATTT CG TTTTGTAAATAATAAAAAGTTAGTTGGGGGTGGTAG CG CG CG TTTGTA

601 GTCCAGCTACT CG GGAGGCTGAGGCAGGAGAAT CG CTTGAACCAGGGAGT CG GAGGTTG
    | | : : | : | : | + + | | | | : | | | | | + + : | | | | : | | | | + + | | | |
601 GTTTTAGTTATT CG GGAGGTTGAGGTAGGAGAAT CG TTTGAATTAGGGAGT CG GAGGTTG

```

```

661 CAGTGAGCCAAGATCGCGCCGCTGCACTCCAGCCTGGCGACAGAGGGGAGACTCCATCTCA
:|||||:|:|:|++++:++:|:|:|:|:|:|++|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
661 TAGTGAGTTAAGATCGCGTGGTTGTATTTTAGTTTGGCGATAGAGGGGAGATTTTATTTTA

721 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTTAACATCTCATCAAATTTGCACCGAGTAGGAAAACAA
|||||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
721 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTTAAATATTTTATTAAATTTGTATCGAGTAGGAAAATAA

781 AAGTTTAAACATGAAACAGATGTTACTGAGGCGAAAGGGTCTCCCAGGCCTGGGAGTC
|||||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
781 AAGTTTAAATATGAAATAGATGTTATTGAGGTGAAAGGGTTTTTTAGGTTTGGGAGTT

841 TGCAGCTTTTATGCAATTCTGCCCTCTGGCCACCGCCAGGGAAGAAAGGTTGTCTCCGTC
||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|
841 TGTAGTTTTTATGTAATTTTGTTTTGGTTATCGTTAGGGAAGAAAGGTTGTTTTCGTT

```

Figura 11. Sequência de DNA de um fragmento da região 5' do gene ADAM 33 contendo a ilha-2 de CpG.

Nota: A ilha-2 de CpG está destacada em amarelo. As regiões destacadas coloridas correspondem às posições dos iniciadores desenhados, cujas seqüências são **F1 ilha33 2:** 5' GTG GTT AGA GGG TAG AAT TG 3'; **R1 ilha33 2:** 5' ATA CCT ATA ATC CCA ACT AC 3'; **F2 ilha33 2:** 5' GTA AAT TTG GAT GAG ATG TTA 3'; **R2 ilha33 2:** 5' CAT ACC ATT ACA CTC CAA TC 3'. Em vermelho estão os dinucleotídeos CpG. : significa conversão de C para T pelo bissulfito de sódio.

3.4.3 Extração de DNA

O perfil de metilação da região promotora do gene *ADAM33* foi avaliado através de tratamento do DNA com bissulfito de sódio seguido de clonagem do fragmento contendo a Ilha de CpG e seqüenciamento. Para tanto, o DNA genômico das diferentes linhagens foi primeiramente extraído através do método de fenol/clorofórmio (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

As linhagens celulares em estudo foram crescidas até confluência total em garrafa média, concentradas por centrifugação e digeridas em 4 mL de tampão TES (1M Tris/HCl, 0,5M EDTA e 10% SDS) contendo 100 µg/mL de Proteinase K por cerca de 18 horas. No dia seguinte, foi feita extração com 1 volume de fenol/clorofórmio e após a obtenção de uma emulsão homogênea a mistura foi centrifugada a 700 x g por 10 minutos e o processo foi repetido até ser obtida uma fase aquosa transparente livre de proteínas. Depois da recuperação da fase aquosa, o DNA foi precipitado a -20 °C por cerca de 18 horas com 1/10 do volume de Acetato de Sódio 3 M, pH 5,2 e 2 volumes de etanol absoluto. No dia seguinte, após centrifugação refrigerada a 4 °C a 8100 x g por 30 minutos, o precipitado de DNA foi lavado com etanol 70%, seco em estufa a 37 °C, ressuspensão em água ultrapura estéril, transferido para tubos de 1,5 mL e armazenado a 8 °C. A qualidade e

quantidade do DNA obtido foram avaliadas através de leituras em espectrofotômetro e gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo a 0,2 µg/mL.

3.4.4 Tratamento de DNA com Bissulfito de Sódio

Os DNAs das linhagens devidamente quantificados em espectrofotômetro Nanodrop (Instituto Ludwig) e dos tumores primários de mama, quantificados no espectrofotômetro Gene QuantII foram submetidos ao tratamento com o bissulfito de sódio. Este agente promove a deaminação de citosinas não metiladas em uracila (que após a reação de PCR são convertidas em timinas), mantendo as citosinas metiladas como citosinas já que o grupamento metila protege contra a primeira etapa da reação de deaminação. O método empregado para tratar o DNA com bissulfito de sódio corresponde a uma adaptação do método de Jerónimo *et al.* (2001). Inicialmente, aproximadamente 1 µg de DNA genômico foi misturado a 0,5 µg/µL de DNA de esperma de salmão e a mistura foi desnaturada com 0,3 M de NaOH a 50 °C por 20 minutos. Após a desnaturação seguiu-se a modificação do DNA com bissulfito de sódio. Nesta etapa, o DNA foi incubado a 70 °C durante 3 horas com 500 µL de uma solução alcalina de bissulfito de sódio/hidroquinona (2,5 M NaHSO₃, 350 mM NaOH e 125 mM C₆H₆O₂). Em seguida, foi adicionado às amostras 1 mL de resina (*Wizard® PCR Preps DNA Purification Resin*, Promega) e a mistura foi passada em uma coluna de purificação (*Wizard Minicolumns*, Promega). Foi feita uma lavagem das amostras com 4 mL de isopropanol 80%, seguido de tratamento com NaOH 0,3 M para completa deaminação do DNA, seguida de precipitação com acetato de amônio 5 M e 350 µL de etanol absoluto. Na etapa de precipitação do DNA, foi adicionado 1 µL de glicogênio 20mg/mL e o DNA modificado foi incubado a -20 °C por um período de 16 a 20 horas. No dia seguinte, após centrifugação durante 30 minutos a 15900 x g, lavagem com etanol 70% e secagem em estufa a 37 °C, o DNA foi ressuspensionado em 30 µL de tampão TE (10 mM Tris HCl pH 8,0 e 1mM EDTA pH 8,0).

Utilizamos também EpiTect® Bissulfite kit (Qiagen) para o tratamento com bissulfito de sódio dos DNAs das linhagens e DNAs tumorais, segundo protocolo fornecido pelo fabricante.

3.4.5 Reação de PCR *nested* para clonagem da Ilha de CpG

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL por tubo contendo 1x tampão de PCR, 3 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 1 U de *Taq* Platinum (Invitrogen), 8 pmoles de iniciadores e 2 µL de DNA previamente tratado com bissulfito de sódio. As reações *nested* foram realizadas nas mesmas condições utilizando de 1-5 µL do produto da primeira reação como molde. As reações foram realizadas em condições *Touch Up* com incremento de 2 °C na temperatura de anelamento após o primeiro ciclo e com aumento de mais 2 °C após o sexto ciclo e seguindo com esta temperatura de anelamento até o final da reação. Para a primeira reação a temperatura inicial de anelamento foi 48 °C e para a reação *nested* a temperatura inicial foi 55 °C. As condições de amplificação do fragmento, tanto na primeira reação como na reação *nested*, foram: desnaturação inicial do DNA por 12 minutos a 95 °C, seguida por 1 ciclo de desnaturação a 94 °C por 3 minutos, temperatura inicial de anelamento por 3 minutos e extensão a 72 °C por 2 minutos, seguida por 5 ciclos de desnaturação a 94 °C por 3 minutos, segunda temperatura de anelamento por 3 minutos e extensão a 72 °C por 2 minutos e, por fim, 35 ciclos sucessivos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, temperatura final de anelamento por 1 minuto e extensão a 72 °C por 1 minuto. Ao final da ciclagem, as moléculas foram estendidas por 7 minutos a 72 °C. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,2 µg/mL.

3.4.6 Clonagem das Ilhas de CpG do gene *ADAM33*

Os fragmentos amplificados por PCR *nested* foram purificados em gel de agarose 1,0% utilizando QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) seguindo as especificações do fabricante. Para a clonagem dos fragmentos, foi utilizado um kit da Invitrogen que contém o plasmídeo pCR2.1®. Esse sistema faz a clonagem de produtos de PCR que possuem adeninas nas extremidades 3' que são adicionadas pela enzima *Taq* Polimerase formando extremidades coesivas durante a reação de amplificação. O vetor linearizado possui timinas nas pontas 3' (também na forma de extremidades coesivas), proporcionando a complementação e ligação. Foram utilizados aproximadamente 30 ng de produto de PCR e 50 ng do vetor pCR2.1® o

que equivale a uma razão molar de 1:3 (vetor:inserto) na reação de ligação, a qual foi realizada segundo as instruções do fornecedor. O produto de ligação foi utilizado para transformação por eletroporação de bactérias *Escherichia coli* (DH10B) eletrocompetentes estocadas em glicerol 15%. Neste processo, foi feita eletroporação em campo elétrico de 4 Ω m 330 μ F em eletroporador (Gibco) de 1,5 μ L do produto de ligação em alíquota de 40 μ L de DH10B eletrocompetente. As células eletrocompetentes foram preparadas conforme protocolo (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Após a eletroporação, as bactérias transformadas foram recuperadas em 1 mL de meio SOC em agitador rotatório a 37 °C e 120 rpm durante 1 h e, finalmente, selecionadas por alfa-complementação em placa de petri contendo meio LBAgar, estreptomicina 20 μ g/ μ L (para seleção da estirpe de *E. coli*) ampicilina 250 μ g/ μ L e canamicina 50 μ g/ μ L (marcas de seleção do vetor), X-gal 25 μ g/mL e IPTG 45 μ g/mL. Para a seleção dos clones a serem seqüenciados, foi realizada uma seleção de 12 colônias brancas de cada placa através de uma reação de PCR, onde, em cada tubo uma colônia selecionada foi palitada. As reações foram realizadas em um volume final de 20 μ L contendo 1X tampão de PCR (Invitrogen), 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, 1 U *Taq* polimerase (Gibco-BRL) e 8 pmoles de iniciadores específicos para o inserto (iniciadores B33F2 e B33R2). As condições da reação foram: desnaturação por 5 minutos a 94 °C e em seguida 30 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, 59 °C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto. Ao final da ciclagem as moléculas foram estendidas por 7 minutos a 72 °C. Os produtos foram observados em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,2 μ g/mL.

3.4.7 Minipreparação de Plasmídeos

Das doze colônias selecionadas para a PCR, oito colônias positivas tiveram seu DNA plasmidial purificado por miniprep realizada com QIAprep® Spin Miniprep kit (Qiagen) segundo protocolo do fabricante. A qualidade e quantificação do DNA plasmidial extraído foi feita visualmente por eletroforese em gel de agarose 1% utilizando como padrão de concentração o vetor circular pGEM a 100 ng.

3.4.8 Reação de Seqüenciamento

Para cada fragmento clonado, 8 colônias foram utilizadas, buscando representatividade de alelos. O seqüenciamento dos fragmentos de DNA tratados com bissulfito de sódio foi realizado segundo a técnica de terminação com dideoxynucleotídeos descrita por Sanger *et al.* (1977) e modificada por Karger *et al.* (1991) utilizando-se o Kit Big Dye terminator (Applied Biosystems) num sistema de 10 µL contendo: 3 µL de Big Dye Terminator v3.0, 1 µL de Tampão Save Money 2,5X (200mM TrisHCl e 5mM MgCl₂), 10 pmoles de iniciadores *forward* ou *reverse* M13 (Invitrogen) e aproximadamente 250 ng de DNA plasmidial. As condições das reações foram: desnaturação por 1 minuto a 96 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos e 60 °C por 2 minutos e 30 segundos para anelamento e extensão. Os produtos do seqüenciamento foram submetidos à eletroforese capilar no seqüenciador automático de DNA ABI 377 (Applied Biosystems).

3.5 ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO ATRAVÉS DO MÉTODO COBRA (COMBINED BISSULFITE RESTRICTION ANALYSIS)

Nesta técnica, o DNA tratado com bissulfito de sódio tem a ilha de CpG do gene *ADAM33* amplificada por PCR *nested* (mesmo produto usado para clonagem) e o produto de PCR é digerido pela enzima *Bst*U I que tem como sítio de restrição CGCG. A presença de metilação nos dinucleotídeos CpG preserva o sítio da enzima após o tratamento com bissulfito de sódio, ao passo que a ausência de metilação modifica o sítio enzimático (C é convertido em T após este tratamento), impedindo a digestão.

Para esta análise, 2 µL (~ 30 ng) do produto de PCR *Nested* (descrito no item 4.4.5) purificado por extração do gel de agarose foram digeridos com 20 unidades da enzima de restrição *Bst*U I (New England Biolabs), num sistema de reação de 20 µL contendo 1X Neb Buffer 2 (New England Biolabs). A digestão ocorreu a 60 °C por 4 horas e o produto de digestão foi revelado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% como descrito no item 3.3.4.

3.6 ANÁLISE DO PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE *ADAM33* EM TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA PELA TÉCNICA DO TRATAMENTO DE DNA COM BISSULFITO DE SÓDIO SEGUIDO DE PCR ESPECÍFICO PARA METILAÇÃO (MSP)

O estudo da metilação do promotor do gene *ADAM33* em DNA de amostras de tumores primários de mama foi feito utilizando-se iniciadores desenhados especificamente para a técnica de MSP (Methylation Specific PCR) descrita por Herman *et al.* (1996). O desenho dos iniciadores para a região do DNA em estudo somente pode ser realizado após o seqüenciamento da Ilha de CpG porque é necessário o conhecimento dos dinucleotídeos importantes no processo de regulação da expressão do gene, ou seja, os dinucleotídeos que se apresentam diferencialmente metilados nas linhagens normal (expressa o gene) e tumorais que não expressam o gene. Os iniciadores foram desenhados para a situação metilada (gene silenciado por metilação) e para a situação não metilada (gene ativo). Os iniciadores foram desenhados dentro da região rica em CpG e possuem pelo menos um dinucleotídeo CG diferencialmente metilado dentro da sua seqüência. Foram desenhados 5 pares de iniciadores de MSP, sendo 5 iniciadores para a situação metilada (M) e 5 para a situação não metilada (U - *unmethylated*), (a fim de testar os melhores pares para esta região que sabidamente tem complicações na padronização das reações). Na figura 12 está representada uma porção da ilha-1 de CpG do gene *ADAM33* onde estão destacadas as regiões escolhidas para o desenho dos iniciadores. Na Tabela 2 estão as seqüências, temperaturas de anelamento e os dinucleotídeos englobados dos iniciadores para MSP melhor padronizados e escolhidos para este trabalho.

tratado com bissulfito de sódio. As condições de amplificação foram: 95°C por 10 minutos para a ativação da enzima seguido de 38 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos, temperatura de anelamento (Tabela 2) por 15 segundos e 45 segundos de extensão a 72 °C; e uma extensão final de 5 minutos a 72 °C. Como controles foram utilizados os DNAs das linhagens HB4a (não metilada) e MDA-MB-435 (metilada). As reações foram analisadas em géis de poliacrilamida 8% corados com nitrato de prata (como já descrito no item 3.3.4).

3.7 CORRELAÇÃO ENTRE O PADRÃO DE METILAÇÃO DO PROMOTOR DO GENE *ADAM33* NOS TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA E OS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS PACIENTES

3.7.1 Obtenção dos Dados Clínico-patológicos

Para cada um dos casos foram levantados os dados clínico-patológicos referentes às pacientes através da análise dos laudos das biópsias dos tumores primários e dos prontuários do HSNG e do HC com o auxílio do Dr Rubens Silveira Lima.

Os dados clínicos levantados foram: estadiamento do tumor segundo a classificação TNM da União Internacional contra o Câncer (UICC) (ANEXO 1), tamanho do tumor, classificação do grau histológico tumoral conforme SBR (Scarff-Bloom-Richardson) (ANEXO 1), comprometimento linfonodal, presença dos marcadores moleculares ER (receptor de estrógeno), PR (receptor de progesterona) e ERBB2, presença de metástase no momento e no seguimento terapêutico da paciente, o aparecimento de recidivas e óbito.

3.7.2 Análise Estatística dos Dados

A análise da associação entre as variáveis qualitativas foi realizada utilizando o programa *Statistical Package for Social Science* (SPSS 12.0) através do teste do qui-quadrado ou teste exato de Fischer. Foi estabelecido um erro de 5%, ou seja, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Este trabalho dá continuidade ao trabalho de tese de doutorado de Daniela Filippini Ierardi, apresentado em 2005 na Pós-Graduação em Oncologia, da Fundação Antônio Prudente em São Paulo e intitulada *“Caracterização do Padrão de Expressão e Metilação dos Genes ADAM 12 e 33 em Tumores de Mama e Sua Correlação com Dados Clínico-Patológicos”*.

Em seu trabalho, a Dra. Daniela fez a análise de expressão do gene *ADAM33* em várias linhagens tumorais de mama, foi feita também a análise de metilação de uma das ilhas (ilha-1) de CpG na região promotora do gene e foram desenhados iniciadores de MSP que foram utilizados em amostras tumorais, porém os resultados não apresentaram correlação com os dados clínicos, não apresentando significância estatística. No presente trabalho, usamos algumas linhagens diferentes das utilizadas anteriormente, sendo elas, HB4a – normal, MDA-MB-231, HB4a C3.6 e ZR-75-31. Também foi desenhado um novo iniciador para a amplificação da ilha-1 de CpG por PCR *Nested*, porque um dos iniciadores utilizados no trabalho anterior estava sobreposto a um dinucleotídeo CpG, o que dificultava muito a amplificação do fragmento de DNA. Desenhamos também iniciadores para amplificar outra ilha da região promotora do gene (ilha-2), a qual apenas foi usada para fazer análise de metilação pela técnica de COBRA. Refizemos a análise de metilação pela técnica de amplificação da região promotora do gene por PCR *nested* utilizando DNA genômico tratado com bissulfito de sódio seguida de clonagem do inserto de interesse e seqüenciamento, adicionamos a técnica COBRA para enriquecer a análise do padrão de metilação das ilhas 1 e 2.

Após os dados de seqüenciamento, planejamos novos iniciadores para MSP, já que aparentemente os iniciadores do trabalho anterior foram desenhados numa região que parece não ter dinucleotídeos significativos para regulação da expressão do gene. Além disso, utilizamos amostras de tumores de um banco de tumores diferente do trabalho de Ierardi (2005).

A seguir estão apresentados alguns resultados obtidos por Ierardi em 2005, nos quais nos baseamos para a realização deste, e em seguida os resultados obtidos no presente trabalho.

4.1 IDENTIFICAÇÃO DE ILHAS DE CPG NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *ADAM33*

Foram identificadas pela Dra. Daniela duas ilhas de CpG pela ferramenta CpGplot (EBI, 2006). A Figura 13 abaixo mostra o resultado da ferramenta de bioinformática.

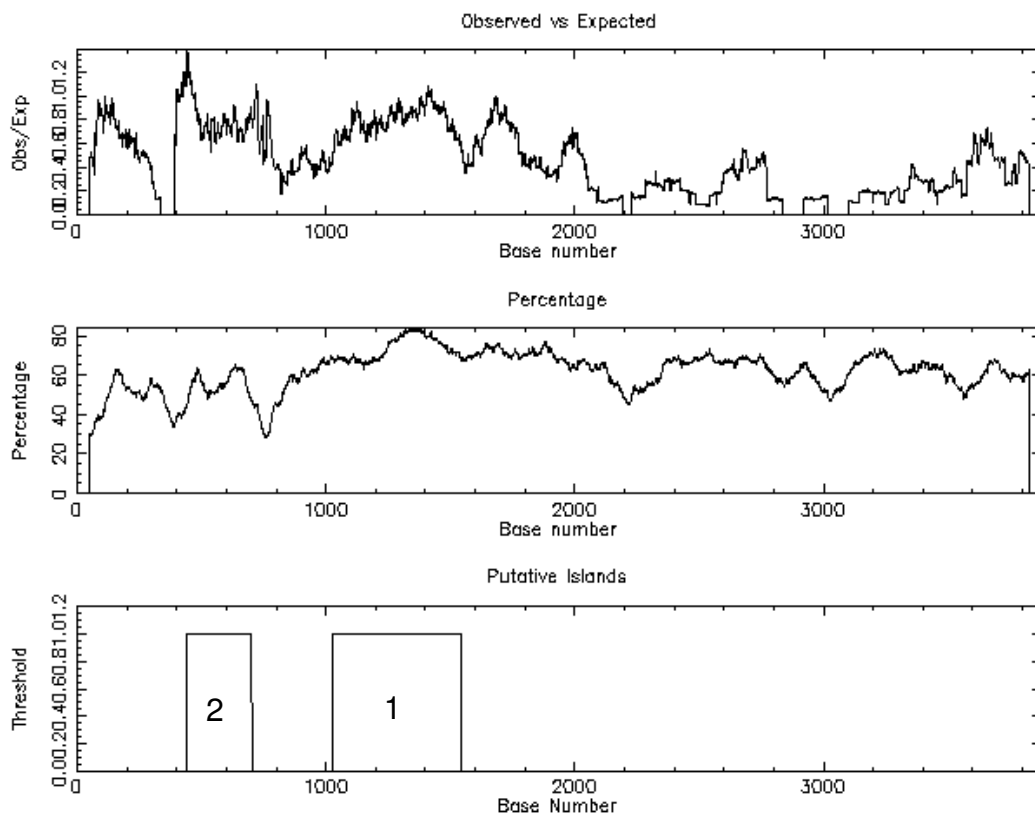


Figura 13. Gráficos representativos das ilhas de CpG presentes na região promotora (2kb à montante 1 kb à jusante da região 5' UTR) do gene *ADAM33*

Fonte: Modificado de EMBOSS (EBI, 2006).

Nota: Os requisitos para uma região ser considerada uma ilha de CpG são: a razão observado/esperado da quantidade de dinucleotídeos CpG ser maior que 0,60; a porcentagem de G mais a porcentagem de C deve ser maior que 50% e o tamanho da sequência deve ser maior que 200 pares de base.

4.2 ESTUDO DA EXPRESSÃO DO GENE *ADAM33*

No trabalho efetuado no Instituto Ludwig em São Paulo foi feita análise de expressão do gene *ADAM33* por RT-PCR. Os dados mostravam que a reação de PCR apresentava muitas bandas inespecíficas, por isso a técnica de Southern

Blotting foi utilizada a partir do produto de PCR para identificação da banda específica de expressão do gene *ADAM33*. A seguir é apresentada a Figura 14 que contém os resultados que foram utilizados como base do nosso trabalho.

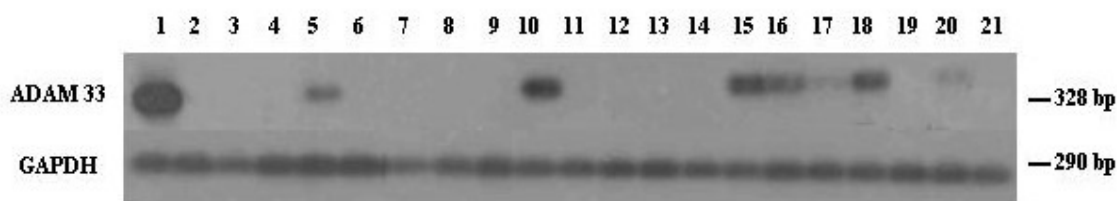


Figura 14. Southern Blotting a partir de reações de RT-PCR do gene *ADAM33* (painel superior) e do gene de expressão constitutiva *GAPDH* (painel inferior) no painel de linhagens tumorais de mama.

Legenda: 1- mama normal; 2- MDA-MB-134; 3- MDA-MB-415; 4- MDA-MB-175; 5- MDA-MB-436; 6- MDA-MB-435; 7- MDA-MB-468; 8- MDA-MB-456; 9- BT-20; 10- ZR-75-30; 11- ZR-75-1; 12- CAMA-1; 13- GI101; 14- 734B; 15- CAL51; 16- MCF7; 17- SK-BR-7; 18- SKBR-5; 19- SK-BR-3; 20- PMC42 e 21- DU4475

Os resultados mostraram que 13 das 20 linhagens, ou seja, 65% das linhagens tumorais não apresentam expressão do gene *ADAM33* (correspondendo à banda de 328 pb) quando comparadas com material obtido de mama normal. As linhagens MDA-MB-436, MCF7, SK-BR-7 e PMC42 apresentaram diminuição da expressão. A partir desses dados o objetivo deste trabalho foi determinar se essa ausência ou diminuição de expressão se deve à presença de metilação na região promotora do gene *ADAM33*. Para isso dispusemos das linhagens MDA-MB-436, MDA-MB-435, MCF7, SK-BR-3 e PMC42 do trabalho anterior e acrescentamos a esses dados resultados com as linhagens tumorais MDA-MB-231, HB4a C3.6 e ZR-75-31. Para normalizar os resultados com linhagens ao invés de material de mama normal, utilizamos uma linhagem imortalizada de células epiteliais de mama considerada uma linhagem normal denominada HB4a (STAMPS *et al.*, 1994).

Para acrescentar aos dados de expressão, as linhagens deste estudo foram cultivadas (linhagens normal HB4a e tumorais de mama) e, seguido ao cultivo, foi feita extração de RNA total usando a técnica do *Trizol Reagent* (Life Technologies USA). A Figura 15 apresenta uma amostra representativa dos resultados de purificação de RNA total.

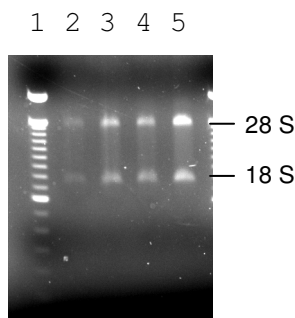


Figura 15. RNA total extraído da linhagem HB4a.

Legenda: 1. 100 bp; 2 - 5. alíquotas de RNA extraído da linhagem HB4A.

A análise do gel mostra que a purificação obteve qualidade e quantidade suficiente de RNA total. Isto porque o gel apresenta as bandas correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S bem evidentes, tendo a primeira o dobro da intensidade da segunda.

A partir da análise dos géis dos RNAs obtidos, foi feita quantificação das amostras com diluição e leitura de absorbância em 260 e 280 nm. Na Tabela 3 abaixo são mostrados os resultados obtidos.

TABELA 3 - QUANTIFICAÇÃO DOS RNAS EXTRAÍDOS PELO ESPECTROFOTÔMETRO GENEQUANT II (PHARMACIA BIOTECH)

Linhagem	Abs 260nm	Abs 280nm	Abs 320nm	Concentração (ng/μL)	Razão 260nm/280nm
HB4a	0,090	0,068	ND	222,9	1,32
MDA-MB-436	0,159	0,098	0,004	621,8	1,62
MCF7	0,126	0,084	0,008	473,6	1,5
MDA-MB-435	0,147	0,087	0,006	560,9	1,69
HB4a C3.6	0,048	0,033	0,008	158,0	1,45
ZR-75-31	0,497	0,244	0,011	1944,0	2,04

A relação entre A260nm e A280nm (DO_{260}/DO_{280}) fornece uma estimativa da pureza dos ácidos nucleicos. Soluções puras de DNA e RNA possuem valores de DO_{260}/DO_{280} entre 1,8 e 2. Se existe contaminação com fenol ou proteínas, a relação DO_{260}/DO_{280} será muito menor, e a precisão nas quantidades de ácidos nucleicos será baixa (SAMBROOK e RUSSEL, 2001). Sendo assim, sabe-se que essas

concentrações medidas são apenas uma estimativa, não sendo preciso o volume da solução de RNA que deve ser usado para conter em torno de 500 ng de RNA para síntese de cDNA. Algumas das amostras analisadas pareciam estar puras e outras não, os contaminantes presentes poderiam atrapalhar nas reações subseqüentes, mas não foi o que se observou nos resultados posteriores.

Foram obtidas também outras leituras diferentes em outros equipamentos, o que nos fez supor que poderiam ocorrer erros de leitura. Além disso, leituras de DNA feitas no Instituto Ludwig em novembro de 2006 se mostraram muito precisas e corretas, confirmando nossas suspeitas. Diante disso, prosseguimos com esses dados para a síntese de cDNA e, como observado mais adiante, não tivemos problemas com os resultados seguintes. Foi feita a síntese de cDNA utilizando o que se estimou ser 500 ng de RNA total. Os resultados de RT-PCR do gene de expressão constitutiva *GAPDH* com 35 ciclos de todas as linhagens mostraram o fragmento esperado de 296pb como observado na Figura 16. Somente com a linhagem ZR-75-31 foi observada a presença de 2 bandas muito próximas, as quais ainda não sabemos exatamente porque ocorrem. A banda menor poderia ser inespecífica, mas esta especulação somente seria confirmada com um experimento de Southern Blotting utilizando como sonda o gene *GAPDH*.

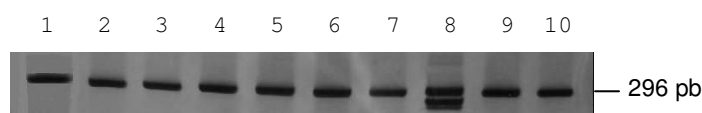


Figura 16. RT-PCR do gene de expressão constitutiva *GAPDH* em linhagens de mama.

Legenda: 1.Marcador Molecular (banda de 300pb) 2.HB4a 3.PMC42, 4.MDA-MB-231, 5.MDA-MB-435, 6.MDA-MB-436, 7.HB4aC3.6, 8.ZR-75-31, 9. MCF7, 10.SK-BR-3.

Os resultados de síntese de cDNA, representados pela RT-PCR do gene de expressão constitutiva *GAPDH*, indicaram que as amostras de RNA estavam adequadas qualitativamente não apresentando contaminação com DNA genômico porque não foi observada a banda de 489 pb que indicaria a presença de fragmentos contendo íntrons (DNA genômico) na preparação. Com esses dados foi dado prosseguimento à avaliação da expressão do gene *ADAM33*. Para isso foi feita RT-PCR com todas as linhagens disponíveis no laboratório e o fragmento esperado deveria conter 334pb (diferente do amplicom da Figura 14, pois o iniciador F foi

redesenhado na tentativa de aumentar a especificidade da reação enquanto o iniciador R foi o mesmo utilizado pela Dra. Daniela) (FIGURA 17).

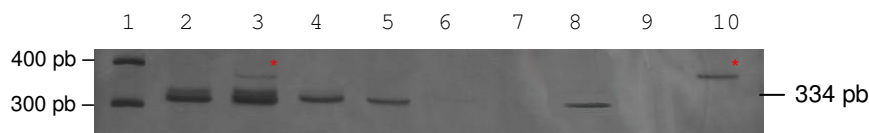


Figura 17. RT-PCR do gene *ADAM33* em linhagens de mama.

Legenda: 1. Marcador Molecular; 2. HB4a; 3. HB4a C3.6; 4.PMC42; 5. MDA-MB-436; 6.MDA-MB-231; 7.MDA-MB-435; 8. MCF7; 9. SK-BR-3; 10.ZR7531. * banda inespecífica.

Os resultados obtidos neste trabalho são parecidos aos obtidos anteriormente por Ierardi (2005), ou seja, a linhagem SK-BR-3 não apresenta expressão do gene *ADAM33* enquanto MCF7 e MDA-MB-436 parecem ter diminuição da expressão quando comparadas com HB4a. As novas linhagens testadas MDA-MB-231 e ZR-75-31 se incluem nas linhagens sem expressão e acrescentam dados para confirmar a diminuição da expressão do gene *ADAM33* em linhagens tumorais de mama.

Para complementar o estudo de expressão do gene *ADAM33*, foi utilizada também a técnica de Western Blotting para verificar a presença da proteína ADAM33 nos extratos protéicos de algumas das linhagens celulares. Foram utilizadas duas linhagens com ausência de expressão por RT-PCR MDA-MB-231 e MDA-MB-435 e como controle positivo HB4a. Para esse fim foi preciso cultivar as células em questão e fazer um extrato das proteínas totais das células. Na Figura 18 observa-se que a integridade das proteínas extraídas foi mantida e a Tabela 4 mostra as concentrações obtidas dos extratos protéicos pelo método de Bradford (1976).

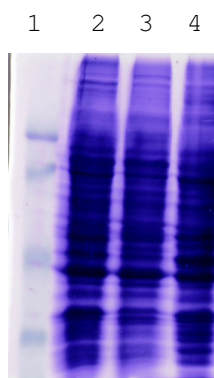


Figura 18. Eletroforese SDS PAGE dos extratos protéicos das linhagens celulares corados com Coomassie® Brilliant Blue R (Sigma).

Legenda: 1. Marcador de massa molecular; 2. HB4a; 3. MDA-MB-231; 4. MDA-MB-435.

TABELA 4 - CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS DOS EXTRATOS DAS LINHAGENS CELULARES DETERMINADA PELO MÉTODO DE BRADFORD (1976)

Linhagem	Concentração ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
HB4a	5,03
MDA-MB-231	15,47
MDA-MB-435	19,59

A partir dos extratos protéicos, foi realizado Western Blotting com 100 μg de proteínas das linhagens e marcação com Anticorpo Anti-ADAM33 para observar a presença ou ausência da proteína traduzida. A figura 19 mostra as bandas da proteína de expressão constitutiva HSP70 utilizado como controle contendo 70 kDa (abaixo). Quanto à proteína ADAM33, podem ser visualizadas duas bandas (~ 64 kDa e ~ 98 kDa – valores determinados graficamente) representando esta proteína provavelmente em diferentes estados de glicosilação (GARLISI *et al.*, 2003). A reação antígeno - anticorpo foi positiva apenas para a linhagem HB4a que é o controle positivo e não se observa nenhuma banda evidente nas linhagens MDA-MB-231 e MDA-MB-435 que também não apresentam expressão por RT-PCR.

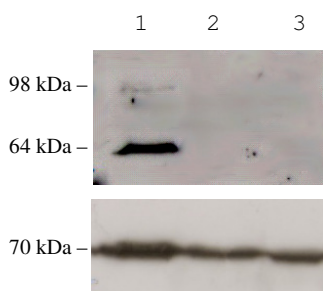


Figura 19. Western Blotting da proteína ADAM33 (acima) e da proteína de expressão constitutiva HSP70 (abaixo) em extratos protéicos das linhagens celulares.

Legenda: 1. HB4a; 2. MDA-MB-231; 3. MDA-MB-435.

A fim de avaliar se a diminuição ou ausência de expressão do gene são devidas à metilação do DNA, foi feito tratamento das culturas com o agente desmetilante 5 aza-2' deoxicitidina. Este composto é uma molécula fosforilada, análoga à citosina que é incorporada à fita do DNA durante a replicação. Uma vez incorporada, ela complexa com as DNMTs e a inativa impedindo a metilação do DNA (BENDER *et al.*, 1999). Quando a linhagem passa a expressar o gene em estudo após o tratamento, há um forte indicativo de que a regulação da expressão do gene ocorre devido a metilação do DNA. Ierardi (2005) em seu trabalho de doutorado fez o tratamento da linhagem tumoral MCF7 que apresenta expressão diminuída do gene *ADAM33* e observou o retorno da expressão gênica. No presente trabalho, foram feitos os tratamentos das linhagens MDA-MB-231, MDA-MB-435 e MDA-MB-436 cujo resultado foi a re-expressão do gene *ADAM33* como mostrado na Figura 20. A linhagem ZR-75-31 também foi submetida ao tratamento com 5 aza-2' deoxicitidina, porém após o tratamento a linhagem não apresentou re-expressão do gene *ADAM33*, indicando que a regulação de expressão nesta linhagem pode se dar por outro tipo de mecanismo, ou ainda significando que o tratamento não foi eficaz. Uma opção seria fazer o tratamento dessa linhagem com trichostatin A que atua como inibidor das Histonas deacetilases, mantendo as histonas com o grupamento acetil em sua cauda N-terminal e promovendo a expressão gênica.

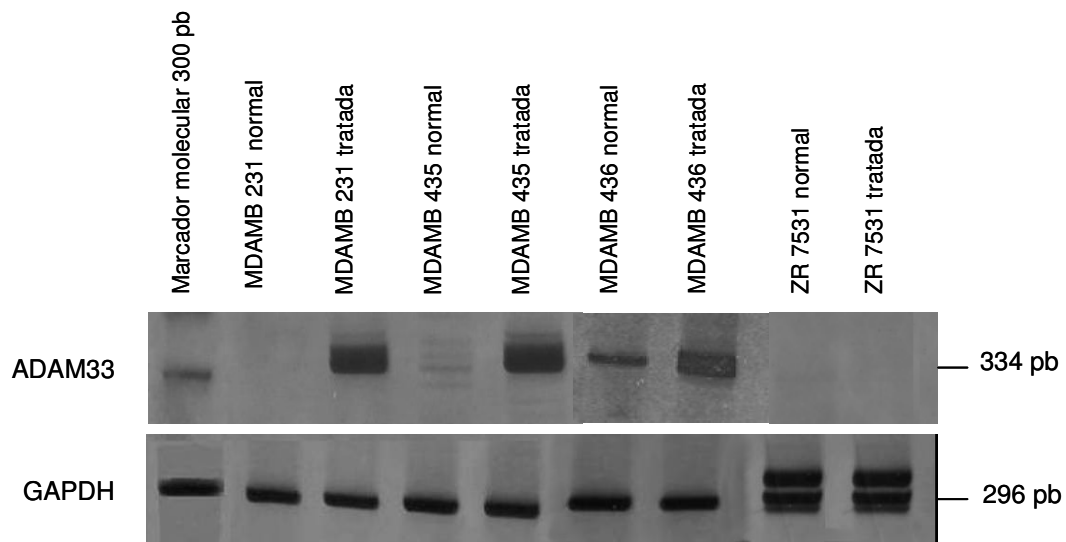


Figura 20. Re-expressão do gene ADAM 33 após o tratamento das linhagens com o agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina.

4.3 SEQÜENCIAMENTO DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *ADAM33* DE LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA, ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO E SUA CORRELAÇÃO COM A EXPRESSÃO GÊNICA

Para iniciar a etapa de seqüenciamento da ilha-1 de CpG da região promotora do gene *ADAM33* nas linhagens tumorais e comparar com a linhagem normal, foi feito cultivo celular das linhagens tumorais e normal seguido de extração do DNA total pelo método do fenol - clorofórmio. A qualidade do material purificado foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% utilizando como controle DNA de massa molecular padrão conhecida. A Figura 21 mostra o perfil de migração das amostras de DNA purificado.

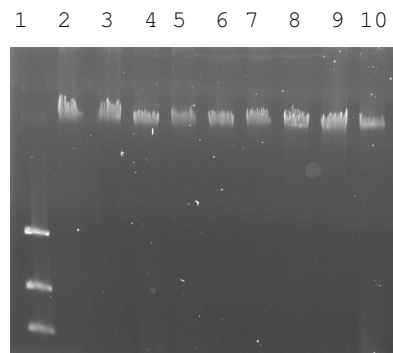


Figura 21. DNA genômico extraídos das linhagens celulares de mama.

Legenda: 1.Low DNA Mass Ladder (banda de cima equivale a 200 ng); 2.MDA-MB-436; 3.PMC42; 4.MDA-MB-231; 5.MDA-MB-435; 6.HB4a C3.6; 7.MCF7; 8.HB4a; 9.SK-BR-3; 10.ZR7531.

As amostras no gel mostram que a purificação foi feita com qualidade e quantidade significativa. A comparação com o marcador de massa molecular mostra que existe pelo menos 200 ng de DNA aplicado em cada *lane*. Além disso, a presença de uma banda única mostra a integridade do DNA purificado que, em outras palavras, não se encontra danificado por quebras em múltiplos pontos.

As amostras de DNA foram a seguir quantificadas por espectrofotometria com leitura de razão 260/280 nm (TABELA 5). A leitura foi realizada no Instituto Ludwig em São Paulo em Equipamento de alta precisão, o espectrofotômetro Nano Drop ND 1000.

TABELA 5 - QUANTIFICAÇÃO DOS DNAs EXTRAÍDOS DE LINHAGENS TUMORAIS

Linhagem (amostra)	Concentração (ng/μL)	Razão 260nm/280nm	Razão 260/230nm
PMC42	57,7	1,94	1,60
MDA-MB-436	70,4	1,92	1,23
MDA-MB-231	90,8	1,89	2,52
MDA-MB-435	91,2	1,92	2,52
HB4a	112,5	1,93	1,89
HB4a C3.6	135,2	1,90	2,34
MCF7	67,5	1,89	2,33
SK-BR-3	361,8	1,93	2,21
ZR-75-31*	238,7	0,49	-

* A linhagem ZR7531 foi quantificada no Gene QuantII.

O espectrofotômetro Nano Drop ND 1000 tem maior precisão do que o GeneQuant II, além disso, ele utiliza apenas 2 μL da amostra, evitando dessa forma erros de diluição. Observa-se pela Razão 260nm/280nm que os DNAs estavam com boa pureza. A razão 260/230nm diz respeito à quantidade de sais na amostra e quanto maior a razão, melhor. Algumas das amostras estão com uma concentração um pouco elevada de sais, porém pelos resultados posteriores observa-se que esse fator não influenciou nos resultados.

Após a quantificação, o DNA das linhagens foi submetido ao tratamento com o agente deaminante bissulfito de sódio. Como controle de eficiência do

tratamento, foi feita uma reação de PCR *nested* do gene SATR-1 (COSTA *et al.*, 2006) do qual se espera um fragmento de 690 pb se o tratamento com bissulfito foi eficiente e se o DNA tratado encontra-se em quantidade suficiente para obter os produtos de PCR. Na Figura 22 observamos que o tratamento foi eficiente. Todas as amostras amplificaram o fragmento de DNA esperado.

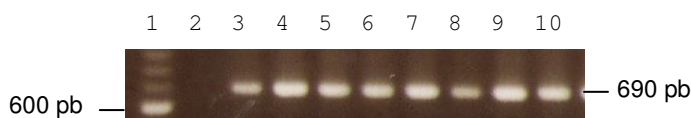


Figura 22. Controle da eficiência do tratamento com bissulfito de sódio - fragmento do gene SATR-1 amplificado por PCR *nested*.

Legenda: 1. MM 100 bp; 2.NO (branco); 3.PMC 42; 4.MDA MB 436; 5.MDA MB 231; 6.MDA MB 435; 7.HB4A; 8.HB4A C 3.6; 9.MCF 7; 10.SKBR 3.

A partir do resultado acima foi realizada a reação de PCR *nested* para amplificar uma parte da região 5' UTR (ilha-1) do gene *ADAM33* que contém dinucleotídeos CpG. A Figura 23 mostra o fragmento de DNA esperado contendo 861pb.

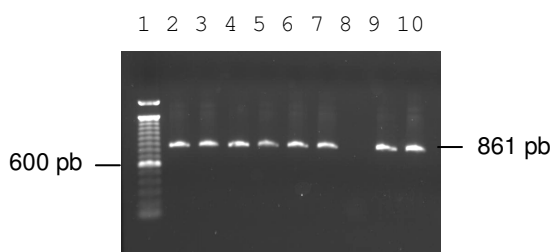


Figura 23. Ilha-1 de CpG do gene *ADAM33* amplificada por PCR *nested*.

Legenda: 1.MM 100bp; 2.HB4a; 3.PMC42; 4.MDA-MB-231; 5.MDA-MB-435; 6.HB4a C3.6; 7.SK-BR-3; 8.ZR-75-31; 9.MCF7; 10.MDA-MB-436

As linhagens MDA-MB-436 e MCF7 apresentaram dificuldades para a amplificação da ilha-1 por PCR *nested*, apenas foi possível amplificar as ilhas-1 dessas duas linhagens com o uso de betaína a 1 M no sistema de PCR. A betaína se liga ao DNA distendendo a fita e reduzindo a formação de estruturas secundárias em DNAs ricos em GC e, desse modo, facilitando o anelamento dos iniciadores e a ligação da *Taq* Polimerase (HENKE *et al.*, 1997).

Não foi possível amplificar a ilha-1 da linhagem ZR-75-31, nem com o uso de betaína. Ainda não se sabe a causa disso, é possível que essa região do DNA

dessa linhagem esteja muito metilada impossibilitando o anelamento dos iniciadores e a polimerização pela enzima devido ao impedimento espacial e conformacional, outra possibilidade é que o gene *ADAM33* tenha sofrido deleção na linhagem ZR-75-31, o que poderia ser comprovado por Southern Blotting utilizando uma sonda para o gene *ADAM33*.

Após a amplificação do fragmento de DNA de 861 pb, foi feita purificação das bandas provenientes do PCR *nested* em gel de agarose 1% e o produto de PCR purificado foi submetido à nova eletroforese para verificar a eficiência de purificação e quantificação visual para a etapa seguinte de clonagem. Na Figura 24 observamos que a purificação foi eficiente.

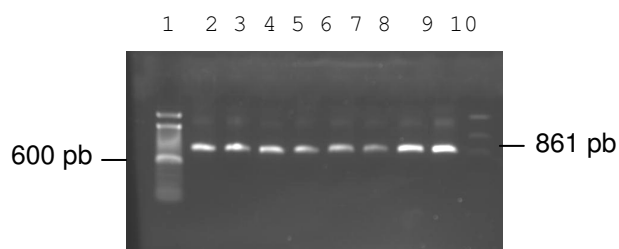


Figura 24. Eletroforese dos produtos de PCR *nested* (fragmentos da ilha-1 do gene *ADAM33*) extraídos do gel de agarose.

Nota: DNA Mass Ladder (banda de cima equivale a 10 ng).

Legenda: 1. MM 100bp; 2. HB4a; 3. PMC42; 4. MDA-MB-231; 5. MDA-MB-435; 6. HB4a C3.6; 7. SK-BR-3; 8. MCF7; 9. MDA-MB-436; 10.

Os fragmentos purificados foram utilizados em um protocolo de clonagem utilizando um kit da Invitrogen que contém o plasmídeo pCR2.1. A Figura 25 está mostrando um exemplo de amplificação do fragmento de 861 pb clonado. As bandas foram obtidas por PCR a partir de colônias brancas, ou seja, seleção de clones recombinantes por alfa complementação (SAMBROOK e RUSSEL, 2001).

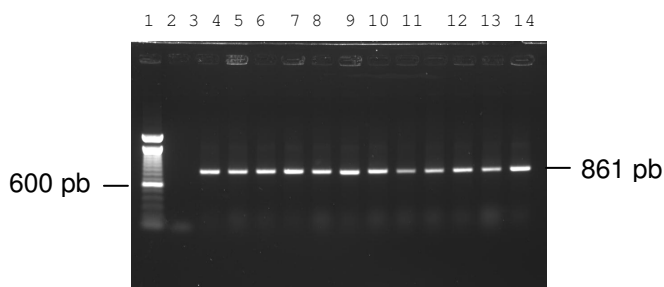


Figura 25. PCR de colônia da ilha-1 do gene *ADAM33* clonada a partir da linhagem HB4a em DH10B.

Legenda: 1. MM 100bp; 2. NO (branco); 3 - 14. Colônias 1 a 12.

Com a confirmação da clonagem, as colônias selecionadas foram cultivadas e o DNA plasmidial foi purificado utilizando protocolo do Kit de purificação de plasmídeos (Qiagen). Na Figura 26 estão mostrados alguns exemplos de plasmídeos obtidos a partir da clonagem da Ilha-1 de CpG da linhagem MCF7 em gel de agarose após a purificação.

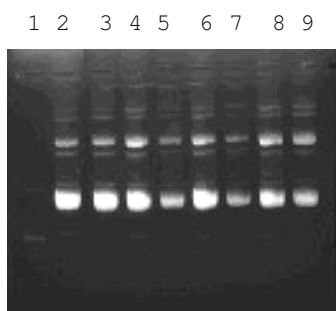
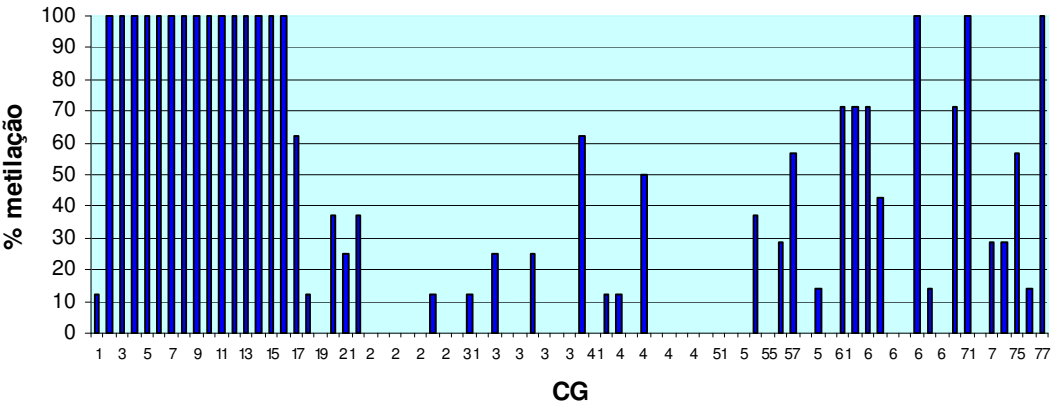


Figura 26. DNA plasmidial extraído de 8 colônias de DH10B transformadas com a ilha-1 de *ADAM33* da linhagem MCF7.

Legenda: 1. 100ng de pGEM íntegro; 2 – 9. Plasmídeos das colônias 1 a 8.

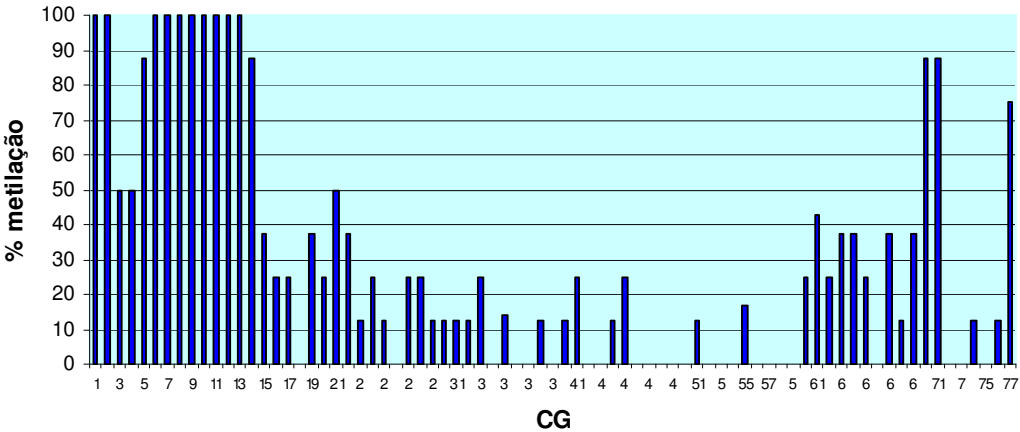
A Figura 26 mostra que o DNA plasmidial de cada colônia apresentava boa quantidade. A seguir, as amostras de DNA de todos os 8 clones de cada linhagem tumoral foram submetidas à reação de seqüenciamento utilizando protocolo do Kit Big Dye *terminator* e seqüenciador ABI Prism 377. No Anexo 3, a Tabela mostra a situação (metilada ou não metilada) de cada dinucleotídeo CG de cada colônia seqüenciada, cujos dados foram utilizados para elaboração dos gráficos da figura 27 abaixo. Embaixo de cada gráfico está a porcentagem total de metilação da ilha-1 de cada linhagem celular. Os gráficos mostram a porcentagem de metilação encontrada para cada dinucleotídeo CG das oito colônias de cada linhagem e abaixo de cada gráfico está a porcentagem de metilação global da linhagem.

A) Porcentagem de Metilação – HB4a



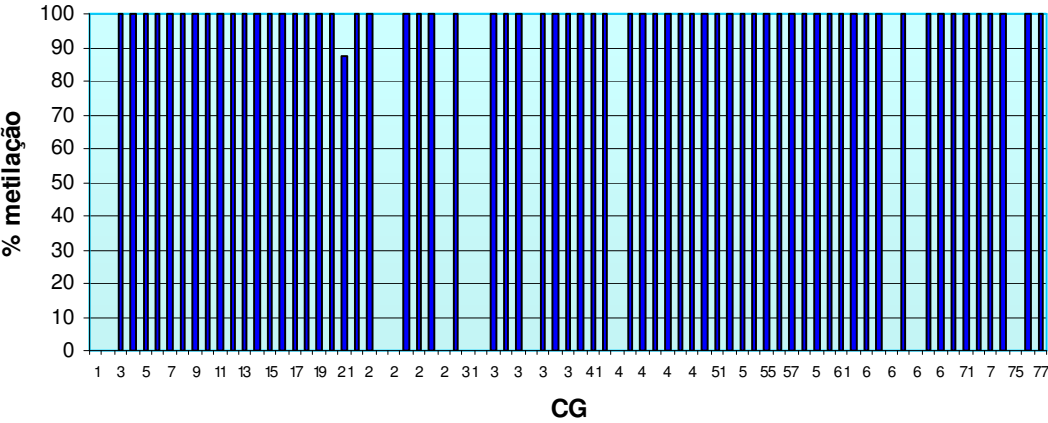
HB4a = 30,8%

B) Porcentagem de Metilação – HB4a C3.6



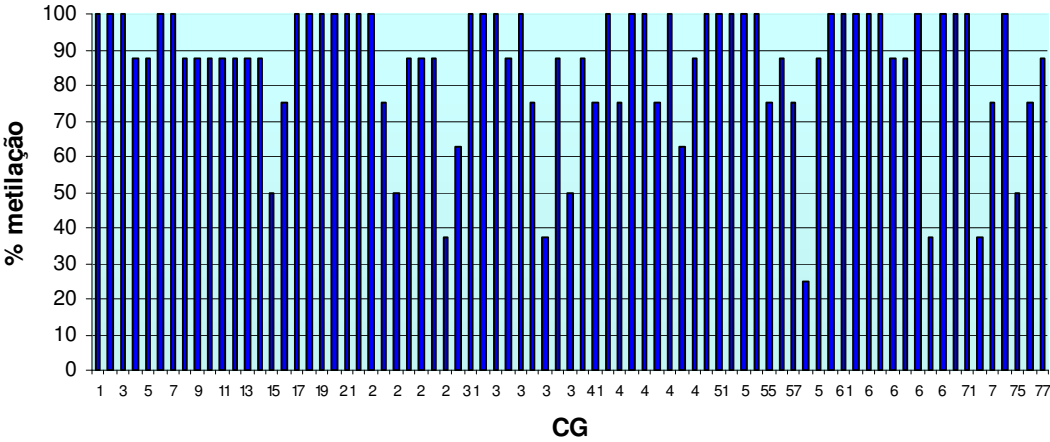
HB4a C3.6 = 28,2%

C) Porcentagem de Metilação MDA-MB-231



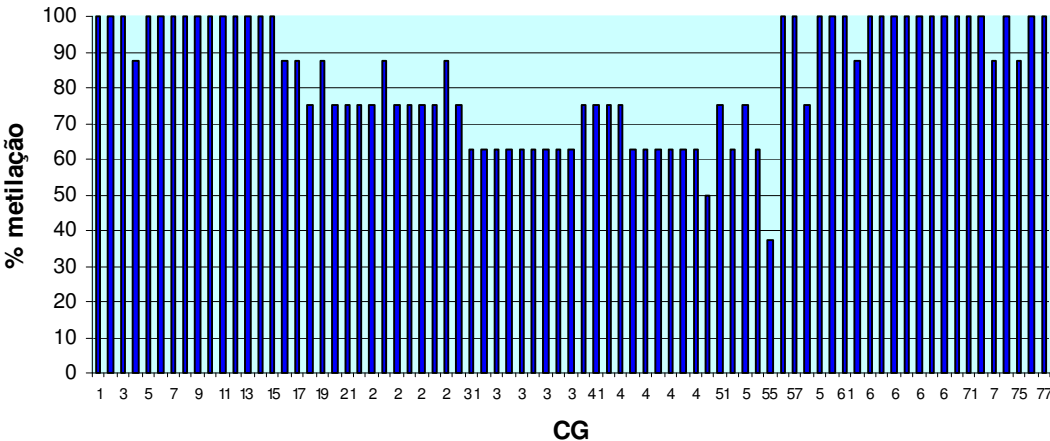
MDA-MB-231 = 85,7%

D) Porcentagem de Metilação – MDA-MB-435



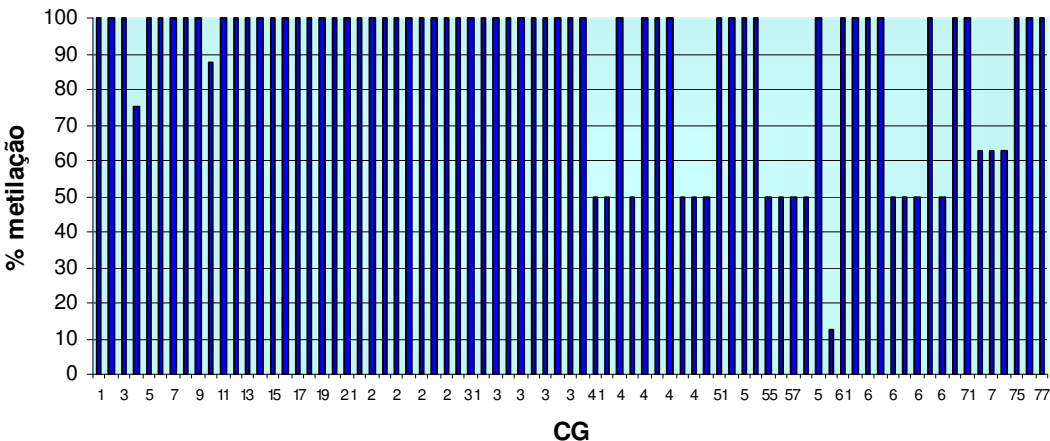
MDA-MB-435 = 85,0%

E) Porcentagem de Metilação – MDA-MB-436



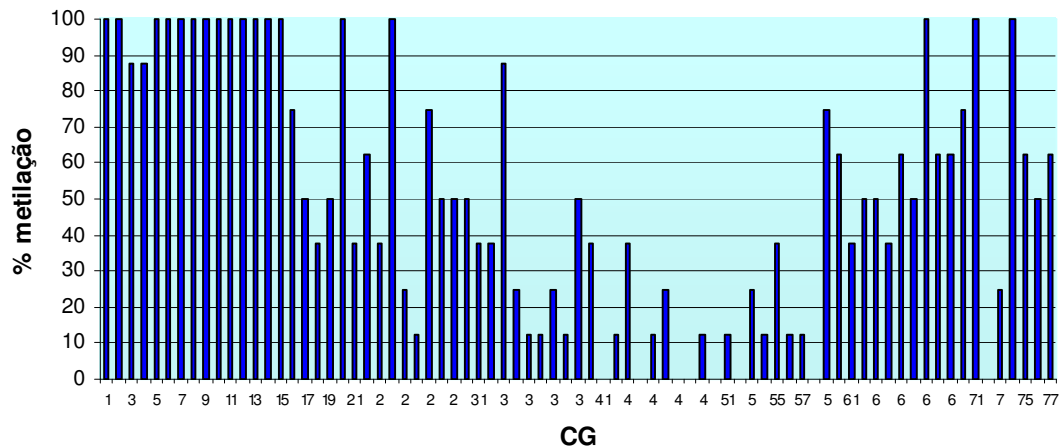
MDA-MB-436 = 82,2%

F) Porcentagem de Metilação – MCF7



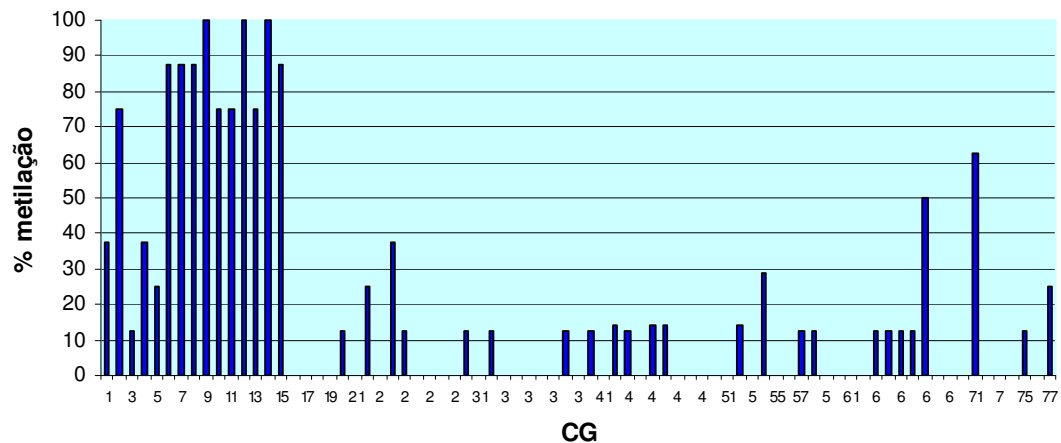
MCF7 = 87,1%

G) Porcentagem de Metilação – PMC42



PMC42 = 49,3%

H) Porcentagem de Metilação – SK-BR-3



SK-BR-3 = 19,1%

Figura 27. Gráficos representativos das porcentagens de metilação de cada dinucleotídeo CpG das linhagens celulares.

Nota: O valor abaixo dos gráficos corresponde à porcentagem de metilação global da respectiva linhagem.

Legenda: A) HB4a; B) HB4a C3.6; C) MDA-MB-231; D) MDA-MB-435; E) MDA-MB-436; F) MCF7; G) PMC42; H) SK-BR-3.

Com exceção da linhagem SK-BR-3, cujo perfil de metilação não tem correlação com o resultado de expressão gênica, todas as linhagens apresentaram um perfil de metilação equivalente à expressão gênica, ou seja, as linhagens que não apresentam expressão possuem grande percentual de metilação na ilha-1 de CpG. Pelos resultados mostrados nos gráficos de perfil de metilação, comparando-

se as linhagens que expressam (HB4a, HB4a C3.6, PMC42) o gene *ADAM33* e as linhagens que não expressam ou tem expressão diminuída do gene (MCF7, MDA-MB-436, MDA-MB-435, MDA-MB-231), podemos observar que os principais dinucleotídeos que são diferencialmente metilados e provavelmente regulam o silenciamento do gene são: 17, 18, 23, 26, 27, 30, 34, 35, 37, 38, 39, 41, 44, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 58, 66, e 72.

Outra técnica utilizada para analisar o perfil de metilação da região promotora dos DNAs das linhagens foi a *Combined Bissulfite Restriction Analysis* (COBRA). A Figura 28 mostra um mapa de restrição para a enzima *Bst*U I da ilha-1 do gene *ADAM33*.

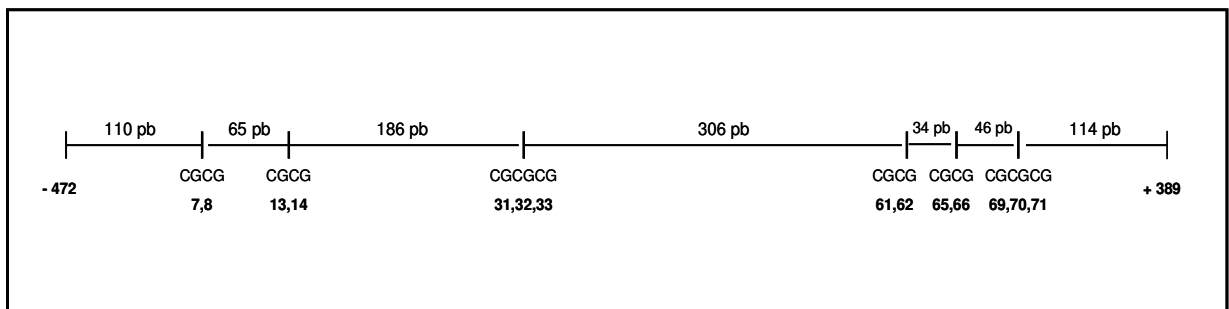


Figura 28. Esquema representativo do mapa de restrição do fragmento amplificado por PCR *nested* contendo a ilha-1 de CpG do gene *ADAM33*.

A Figura 29 mostra o fragmento da ilha-1 do gene *ADAM33* das linhagens celulares digerido por *Bst*U I. A técnica COBRA não foi reprodutível, o padrão de bandas digeridas não se repete numa mesma linhagem. Isto pode ser devido a heterogeneidade de distribuição de metilação ao longo da ilha de CpG, como descrito por Turker (2002).

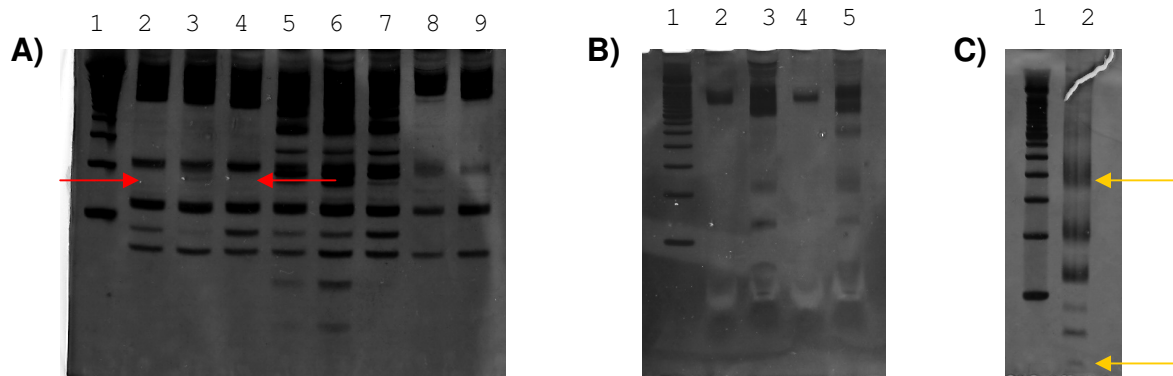


Figura 29. COBRA da ilha-1 do gene *ADAM33*.

Nota: As flechas vermelhas mostram o padrão de digestão de uma linhagem que não expressa o gene *ADAM33* (MDA-MB-231) e de uma linhagem que apresenta expressão normal do gene (HB4a). As flechas amarelas mostram bandas da linhagem PMC42 que não estão presentes nas outras fotos.

Legenda: (A) 1. MM 100 bp; 2. HB4a; 3. PMC42; 4. MDA-MB-231; 5. MDA-MB-435; 6. MDA-MB-436; 7. MCF7; 8. SK-BR-3; 9. HB4a C3.6. (B) 1. MM 100bp; 2. ilha-1 íntegra PMC42; 3. ilha-1 digerida PMC42; 4. ilha-1 íntegra SK-BR-3; 5. ilha-1 digerida SK-BR-3. (C) 1. MM 100 bp; 2. PMC42.

Os resultados de digestão corroboram a análise do seqüenciamento, no qual observa-se que a maioria destes sítios (FIGURA 28) apresentam-se metilados em quase todas as linhagens. Sendo assim, espera-se que todas as linhagens apresentem bandas provenientes da digestão (cada qual com seu padrão particular) e conclui-se que os dinucleotídeos presentes nos sítios de restrição da enzima *Bst*I não são importantes para a regulação gênica. COBRA foi uma técnica suplementar para confirmar o padrão de metilação do DNA. Geralmente essa técnica é utilizada em tumores para análise de metilação, entretanto no nosso caso, como já havíamos previsto por nossos dados de sequenciamento, isso não foi possível.

Foi analisado também, pelo método de COBRA, o perfil de metilação de outra ilha de CpG da região promotora do gene *ADAM33*, a qual foi denominada de ilha-2. Para essa análise, o fragmento de 417 pb da ilha-2 foi amplificado por PCR *nested*. A Figura 30 mostra os produtos de PCR *nested*.

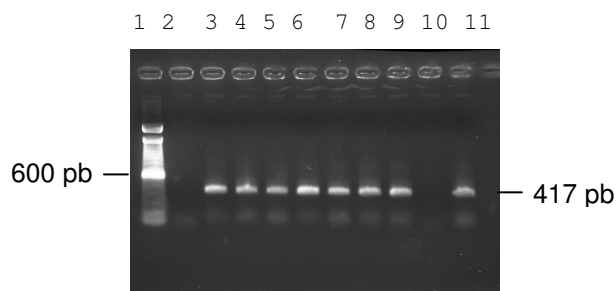


Figura 30. Ilha-2 do gene *ADAM33* amplificada por PCR *nested*.

Legenda: 1. MM 100bp; 2. NO (branco); 3. HB4a; 4. PMC42; 5. MDA-MB-231; 6. MDA-MB-436; 7. MCF7; 8. SK-BR-3; 9. HB4a C3.6; 10. ZR-75-31; 11. MDA-MB-435.

Novamente pode-se observar que foi possível amplificar as ilhas-2 de todas as linhagens com exceção da linhagem ZR-75-31.

Na Figura 31 o fragmento amplificado da ilha-2 está representado esquematicamente com os sítios de restrição da enzima *Bst*U I e a figura 32 mostra o resultado da digestão da ilha-2 com o padrão de bandas digeridas por *Bst*U I (COBRA) das linhagens analisadas.

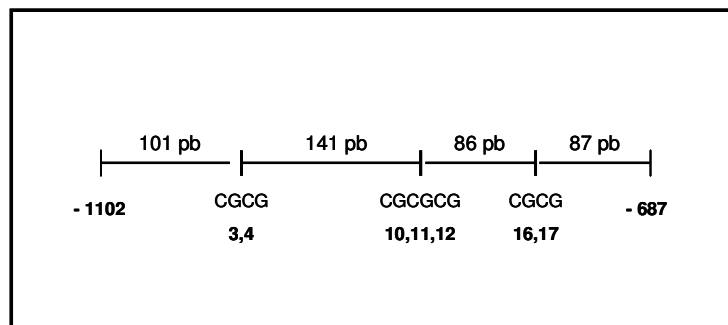


Figura 31. Esquema representativo do mapa de restrição do fragmento amplificado por PCR *nested* contendo a ilha-2 de CpG do gene *ADAM33*.

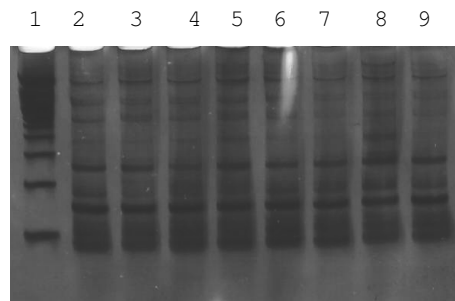


Figura 32. COBRA da ilha-2 do gene *ADAM33*. 1. MM 100bp; 2. HB4a; 3. PMC42; 4. MDA-MB-231; 5. MDA-MB-435; 6. MDA-MB-436; 7. MCF7; 8. SK-BR-3; 9. HB4a C3.6.

Esta análise demonstrou que o padrão de digestão pela *Bst*U I é o mesmo para todas as linhagens celulares, o que não condiz com o padrão de expressão. Esse dado pode significar que a ilha-2 não é importante para o silenciamento do gene, ou ainda que os dinucleotídeos CpG dos sítios reconhecidos pela enzima não são relevantes para a regulação da expressão deste gene. Desta maneira, o estudo da ilha-2 foi descartado.

4.4 CORRELAÇÃO DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS COM OS RESULTADOS DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO DO GENE *ADAM33* EM AMOSTRAS DE TUMORES PRIMÁRIOS DE MAMA

4.4.1 Methylation Specific PCR (MSP)

Após a análise com os DNAs das linhagens chegamos à conclusão de quais dinucleotídeos da ilha-1 de CpG seriam importantes para o silenciamento do gene *ADAM33*. Os iniciadores desenhados para os dinucleotídeos 47, 51, 52 e 53 foram utilizados para MSP, os quais foram os únicos a apresentarem os resultados esperados após exaustiva padronização com todas as combinações dos 5 pares desenhados para esta técnica. Para padronização das reações de MSP, foram utilizados os DNAs das linhagens tumorais tratados com bissulfito de sódio e o resultado esperado seria que a banda correspondente ao amplicom de 64 pb fosse amplificada apenas nas respectivas reações M (DNA metilado) ou U (DNA não metilado) segundo o resultado do seqüenciamento. A figura 33 abaixo mostra a padronização das reações U (unmethylated) e M (methylated) nas linhagens tumorais. É possível observar que os resultados desta técnica estão de acordo com os resultados do seqüenciamento.

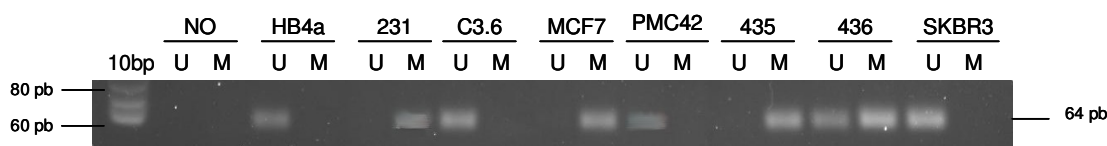


Figura 33. Padronização da Técnica MSP nas linhagens tumorais.

Herman *et al.* (1996), ao descrever a técnica de MSP, relataram uma sensibilidade de 0,1%, ou seja, seu método foi capaz de detectar até 1 alelo metilado em meio a 1000 alelos não metilados. Para verificar se a mesma sensibilidade estava sendo atingida em nossos experimentos com nossos iniciadores específicos para o gene *ADAM33*, realizamos reações de MSP utilizando diferentes diluições de DNA de linhagem tumoral que se apresentou totalmente metilada nos dinucleotídeos escolhidos para os iniciadores (com relação ao resultado do seqüenciamento das 8 colônias), sendo considerado então que essa

linhagem possui teoricamente 100% dos alelos metilados. Foram feitas as seguintes diluições 1:0 (100% de alelos metilados), 1:10 (10% de alelos metilados), 1:50 (2% de alelos metilados), 1:100 (1% de alelos metilados), 1:250 (0,4% de alelos metilados), 1:500 (0,2% de alelos metilados), 1:1000 (0,1% de alelos metilados) e 1:5000 (0,02% de alelos metilados). Obtivemos a sensibilidade de 0,1% de alelos metilados (FIGURA 34), que é a mesma sensibilidade detectada por Herman *et al.* (1996), o que significa que a técnica é capaz de detectar até 1 alelo metilado em meio a 1000 alelos não-metilados.

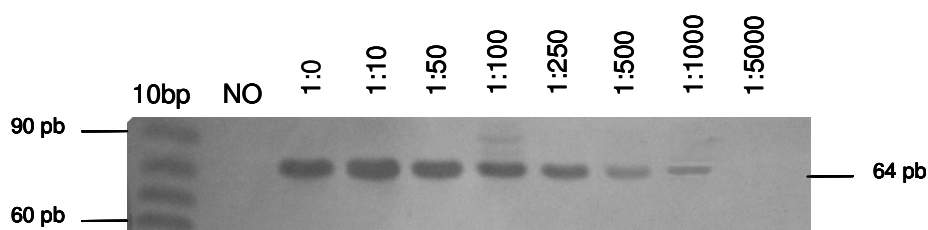


Figura 34. Teste de sensibilidade da técnica de MSP.

Nota: As proporções acima equivalem às diluições do DNA da linhagem MDA-MB-435 (totalmente metilada nos CGs 47, 51, 52 e 53).

A técnica de MSP é importante para o estudo da expressão de um gene em amostras de tumores, já que para estes não se espera fazer a clonagem e seqüenciamento da Ilha de CpG, nem RT-PCR (neste trabalho). Para análise de correlação dos dados clínico-patológicos com os resultados de metilação foram utilizados tumores primários de mama do Banco de Tumores do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética. Os DNAs desses tumores foram extraídos pelo protocolo do fenol-clorofórmio pelo Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética e alguns também pelo nosso laboratório (seguindo o mesmo protocolo de extração de DNA de linhagens celulares). A Figura 35 mostra o aspecto de alguns DNAs tumorais extraídos. Percebe-se que quase todos apresentam um pouco de degradação, ou seja, o DNA possui quebras em pontos múltiplos apresentando um aspecto arrastado no gel, porém observa-se pela banda formada acima do arrastado, que ainda existe DNA genômico íntegro nas amostras. Essa degradação pode ser atribuída à estocagem inadequada das peças tumorais. Sabemos que no momento estão estocadas adequadamente a -80 °C, sendo que o ideal é o que se faz no Hospital do Câncer em São Paulo, onde a estocagem das amostras é feita em nitrogênio líquido com material resinoso especial. Além disso,

essa degradação observada pode ser também devido ao não congelamento das peças tumorais imediatamente após a cirurgia ou ao transporte do hospital ao laboratório, que não é feito em nitrogênio líquido como recomendado. Provavelmente o conjunto destes fatores acabou por levar as amostras a irem perdendo a integridade de suas macromoléculas, porém os experimentos demonstraram que a degradação não impediu que a técnica de MSP funcionasse.

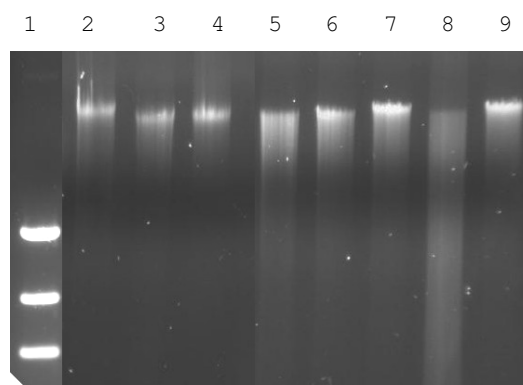


Figura 35. Aspecto dos DNAs tumorais extraídos a partir de 8 amostras de tumores primários das pacientes em estudo.

Os DNAs extraídos foram então submetidos ao tratamento com bissulfito de sódio. Após o tratamento, todos os DNAs foram testados com a reação de PCR *nested* para SATR-1. A Figura 36 mostra o resultado de uma reação padrão para verificação da eficácia do tratamento com bissulfito de sódio de alguns dos tumores analisados. Na foto é possível observar que todos os DNAs foram eficientemente tratados com o bissulfito de sódio.

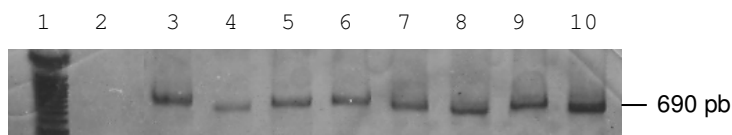


Figura 36. Controle da eficiência do tratamento com bissulfito de sódio - fragmento da região SATR-1 amplificado por PCR *nested*

Legenda: 1. MM 100 bp; 2. NO (branco); 3. Amostra 1; 4. Amostra 2; 5. Amostra 3; 6. Amostra 4; 7. Amostra 5; 8. Amostra 6; 9. Amostra 7; 10. Amostra 8.

Os DNAs tumorais tratados com bissulfito de sódio foram então submetidos às reações U e M de MSP. Todas as amostras apresentam resultado positivo (banda correspondente a 64 pb) para a reação U, isto se deve ao fato de que numa amostra tumoral existem células normais que são retiradas junto ao tumor durante a cirurgia, e o padrão normal de metilação do gene *ADAM33* nas células de mama é ausência de metilação. Utilizamos 3 amostras de fibroadenomas para representar tecido não-maligno de mama. Estas amostras se apresentam desmetiladas, ou seja, apenas a reação U é positiva (FIGURA 37).

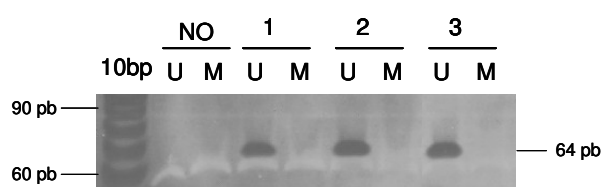


Figura 37. MSP do gene *ADAM33* em amostras de fibroadenomas.

Nota: 10 bp é o marcador de massa molecular.

Legenda: 1, 2 e 3 correspondem aos números das amostras de fibroadenomas. NO é o branco do MSP. As letras U (unmethylated) e M (methylated) correspondem às reações U e M respectivamente.

A seguir estão todos os resultados obtidos por MSP separados por tipo de tumor (ductal ou lobular) e grau histológico (SBR) (FIGURAS 38 a 44).

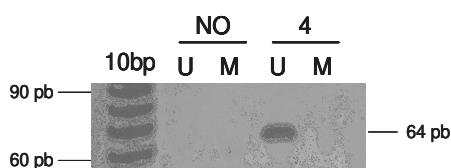


Figura 38. MSP do gene *ADAM33* em amostra de carcinoma ductal *in situ*.

Nota: 10 bp é o marcador de massa molecular. As letras U (unmethylated) e M (methylated) correspondem às reações U e M. NO é o branco do MSP e o número 4 corresponde ao número da amostra tumoral.

D)

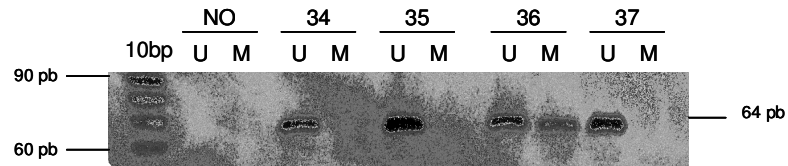
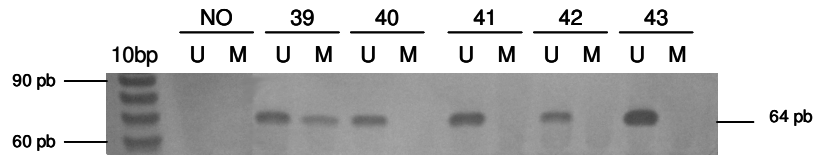


Figura 40. MSP do gene *ADAM33* em amostras de carcinoma ductal invasivo de grau II (SBR).

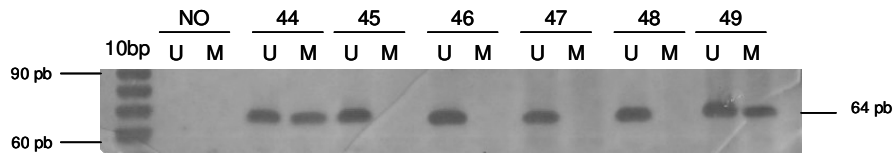
Nota: 10 bp é o marcador de massa molecular. As letras U (unmethylated) e M (methylated) correspondem às reações U e M. NO é o branco do MSP e os números correspondem às amostras de tumor.

Legenda: A) Amostras 17 a 22. B) Amostras 23 a 28. C) Amostras 29 a 33. D) Amostras 34 a 37.

A)



B)



C)

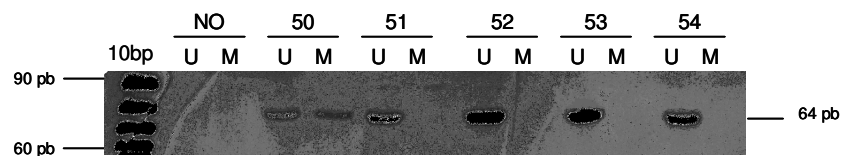
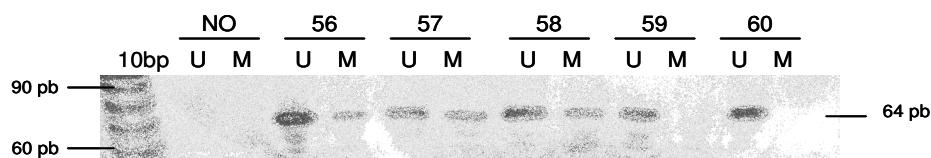


Figura 41. MSP do gene *ADAM33* em amostras de carcinoma ductal invasivo de grau III (SBR).

Nota: 10 bp é o marcador de massa molecular. As letras U (unmethylated) e M (methylated) correspondem às reações U e M. NO é o branco do MSP e os números correspondem às amostras de tumor.

Legenda: A) Amostras 39 a 43. B) Amostras 44 a 49. C) Amostras 50 a 54.

A)



B)

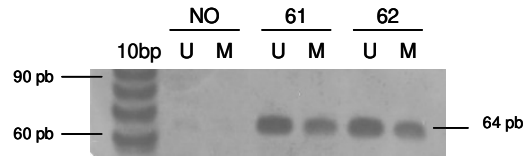
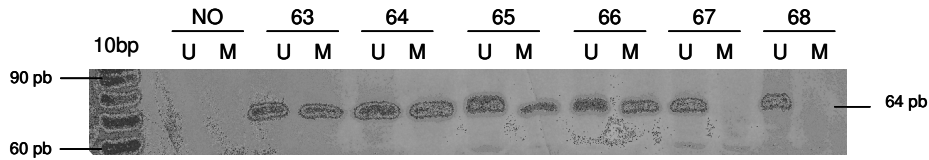


Figura 42. MSP do gene *ADAM33* em amostras de carcinoma lobular invasivo de grau I (SBR).

Nota: 10 bp é o marcador de massa molecular. As letras U (unmethylated) e M (methylated) correspondem às reações U e M. NO é o branco do MSP e os números correspondem às amostras de tumor.

Legenda: A) Amostras 56 a 60. B) Amostras 61 e 62.

A)



B)

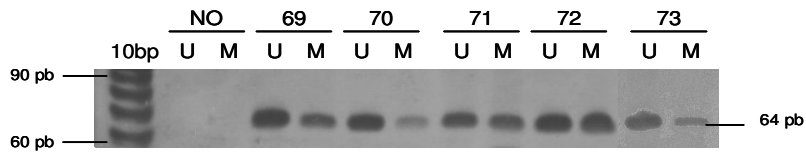


Figura 43. MSP do gene *ADAM33* em amostras de carcinoma lobular invasivo de grau II (SBR).

Nota: 10 bp é o marcador de massa molecular. As letras U (unmethylated) e M (methylated) correspondem às reações U e M. NO é o branco do MSP e os números correspondem às amostras de tumor.

Legenda: A) Amostras 63 a 68. B) Amostras 69 a 73.

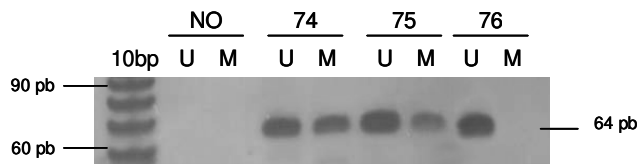


Figura 44. MSP do gene *ADAM33* em amostras de carcinoma lobular invasivo de grau III e grau indeterminado (SBR).

Nota: 10 bp é o marcador de massa molecular. As letras U (unmethylated) e M (methylated) correspondem às reações U e M. NO é o branco do MSP e os números correspondem às amostras de tumor 74 a 76.

4.4.2 Análise Estatística dos Dados Clínico-patológicos Correlacionados com a Metilação da Região Promotora do Gene *ADAM33*

A Tabela do Anexo 4 contém os dados clínicos das pacientes cujos tumores foram analisados neste estudo e seus respectivos resultados de MSP. Na Tabela 6, abaixo, estão mostrados os dados da análise estatística e a correlação entre a metilação e as variáveis clínicas. Das 73 amostras tumorais malignas analisadas, 14 (20,0%) foram diagnosticadas com estágio I/0, 33 (47,1%) com estágio II, 13 (18,6%) com estágio III e 10 (14,3%) com estágio IV, sendo que 3 amostras não foram classificadas para esta variável. O tamanho do tumor foi avaliado nas 73 amostras, das quais 20 (27,4%) estão classificadas como T1 (tumor menor ou igual a 2 cm), 38 (52,1%) estão classificadas como T2 (tumor maior que 2 cm e menor ou igual a 5 cm), 8 (10,9%) estão classificadas como T3 (tumor maior que 5 cm) e 7 (9,6%) estão classificadas como T4 (tumor de qualquer tamanho com extensão para parede torácica e/ou edema, ou ulceração da pele, ou carcinoma inflamatório). O comprometimento linfonodal foi avaliado em 71 amostras, dentre as quais 37 (52,1%) apresentaram linfonodos comprometidos. Além disso, foi verificado que 14 (20,3%) de 69 pacientes apresentaram metástases à distância com óbito. As recidivas locais foram avaliadas em 69 amostras, aparecendo em 6 (8,7%) pacientes. A avaliação da expressão de receptores hormonais apresentou positividade para Receptor de Estrógeno em 58 (82,9%) das 70 amostras avaliadas, já para receptor de progesterona, das 61 amostras determinadas, 46 (75,4%) são positivas. A expressão de *ERBB2* foi pesquisada em 65 amostras, sendo que 22 (33,8%) destas foram positivas.

A frequência de metilação nas amostras analisadas foi de 29 (39,7%) em 73. Esta frequência aumenta e se torna estatisticamente significativa ($p=0,0002$) nas amostras de carcinomas lobulares invasivos, das quais 76,2% apresentam metilação da região promotora do gene *ADAM33*, comparando-se com as amostras de carcinoma ductal invasivo que apresentam metilação em apenas 25,5% dos casos. Este resultado pode ser melhor visualizado no gráfico da Figura 45. Um aumento da frequência de metilação também é observado nos tumores de tamanhos T3 e T4, quando comparado aos tumores de tamanhos menores. As frequências de metilação nos tamanhos T1 (30,0%) e T2 (36,8%) foram constantes, enquanto que em T3/T4 foi observado uma frequência de 60% de metilação que equivale a praticamente o

dobro das freqüências dos outros grupos, porém essas diferenças não foram consideradas estatisticamente significativas ($p=0,174$). Outra variável que apresentou uma freqüência de metilação aumentada foi a presença de recidivas locais, cujas amostras positivas para esta variável apresentaram uma freqüência de 66,7% de metilação contra 36,5% de metilação das amostras negativas. Porém, esta diferença não obteve significância estatística ($p=0,201$).

Não foram observadas em nossas amostras correlações estatisticamente significativas entre a metilação na região promotora do gene *ADAM33* e o estadio ($p=0,641$), o grau de diferenciação histológico (SBR) ($p=0,799$), o comprometimento de linfonodos ($p=0,965$), a ocorrência de metástases à distância ($p=0,548$), a expressão de receptores hormonais (ER, $p=0,751$ e PR, $p=0,678$) nem do receptor de fator de crescimento ERBB2 ($p=0,378$). As freqüências de metilação para todas estas variáveis ficaram em torno de 30 a 40%.

TABELA 6 - DISTRIBUIÇÃO CATEGÓRICA DOS DADOS CLÍNICOS DAS PACIENTES ANALISADAS E A FREQUÊNCIA DE METILAÇÃO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *ADAM33* AVALIADAS PELO TESTE DO QUI-QUADRADO OU TESTE EXATO DE FISCHER

Variável	Pacientes Número (%)	Metilação		p
		Sim	Não	
Estádio				
0/I	14 (20,0)	4 (28,6)	10 (71,4)	0,641
II	33 (47,1)	14 (42,4)	19 (57,6)	
III/IV	23 (32,9)	8 (34,8)	15 (65,2)	
Tamanho do tumor				
pT1/pTis	20 (27,4)	6 (30,0)	14 (70,0)	0,174
pT2	38 (52,1)	14 (36,8)	24 (63,2)	
pT3/pT4	15 (20,5)	9 (60,0)	6 (40,0)	
SBR				
I	19 (27,1)	8 (42,1)	11 (57,9)	0,799
II	33 (47,1)	14 (42,4)	19 (57,6)	
III	18 (25,7)	6 (33,3)	12 (66,7)	
Comprometimento de linfonodos				
Negativo	34 (47,9)	13 (38,2)	21 (61,8)	0,965
Positivo	37 (52,1)	15 (40,5)	22 (59,5)	
Receptor de Estrógeno (ER)				
Negativo	12 (17,1)	4 (33,3)	8 (66,7)	0,751
Positivo	58 (82,9)	24 (41,4)	34 (58,6)	
ERBB2				
Negativo	43 (66,2)	18 (41,9)	25 (58,1)	0,378
Positivo	22 (33,8)	6 (27,3)	16 (72,7)	
Receptor de progesterona (PR)				
Negativo	15 (24,6)	4 (26,7)	11 (73,3)	0,678
Positivo	46 (75,4)	17 (36,9)	29 (63,1)	
Metástase/óbito				
Negativo	55 (79,7)	23 (41,8)	32 (58,2)	0,548
Positivo	14 (20,3)	4 (28,6)	10 (71,4)	

Continua...

Continuação					
Recidiva					
Negativo	63 (91,3)	23 (36,5)	40 (63,5)	0,201	
Positivo	6 (8,7)	4 (66,7)	2 (33,3)		
Tipo de tumor					
Carcinoma Ductal Invasivo	51 (70,8)	13 (25,5)	38 (74,5)	0,0001972	
Carcinoma Lobular Invasivo	21 (29,2)	16 (76,2)	5 (23,8)		

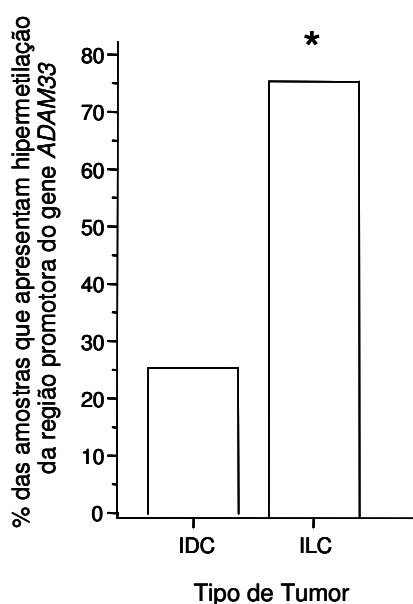


Figura 45. Gráfico de frequência de metilação do promotor do gene *ADAM33* em carcinomas ductais e lobulares.

Nota: O asterisco mostra diferença significativa na porcentagem de metilação entre os tipos de tumores.

Legenda: IDC: carcinomas ductais invasivos, ILC: carcinomas lobulares invasivos.

Para nos certificarmos de que as variáveis estudadas não apresentavam correlação com a metilação dentro do grupo de tumores lobulares, que possuem uma alta frequência de metilação, realizamos a análise estatística das variáveis apenas para as amostras de carcinoma lobular invasivo. A Tabela 7 abaixo mostra os resultados desta análise, que não encontrou significância estatística para nenhuma das variáveis.

TABELA 7 - DISTRIBUIÇÃO CATEGÓRICA DOS DADOS CLÍNICOS DAS PACIENTES COM CARCINOMA LOBULAR INVASIVO E A FREQUÊNCIA DE METILAÇÃO NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *ADAM33* AVALIADAS PELO TESTE EXATO DE FISCHER

Variável	Pacientes Número (%)	Metilação		p
		Sim	Não	
Estádio				
I/II	15 (78,9)	11 (73,3)	4 (26,7)	1,000
III/IV	4 (21,1)	3 (75,0)	1 (25,0)	
Tamanho do tumor				
pT1/ pT2	15 (71,4)	11 (73,3)	4 (26,7)	1,000
pT3/pT4	6 (28,6)	5 (83,3)	1 (16,7)	
SBR				
I	7 (36,8)	5 (71,4)	2 (28,6)	0,603
II/III	12 (63,2)	10 (83,3)	2 (16,7)	
Comprometimento de linfonodos				
Negativo	12 (57,1)	9 (75,0)	3 (25,0)	1,000
Positivo	9 (42,9)	7 (77,8)	2 (22,2)	
Receptor de Estrógeno (ER)				
Negativo	2 (10,5)	2 (100)	0 (0)	1,000
Positivo	17 (89,5)	13 (76,5)	4 (23,5)	
ERBB2				
Negativo	15 (88,2)	11 (73,3)	4 (26,7)	1,000
Positivo	2 (11,8)	2 (100)	0 (0)	
Receptor de progesterona (PR)				
Negativo	3 (21,4)	2 (66,7)	1 (33,3)	1,000
Positivo	11 (78,6)	8 (72,7)	3 (27,3)	
Metástase/óbito				
Negativo	15 (83,3)	12 (80,0)	3 (20,0)	0,554
Positivo	3 (16,7)	2 (66,7)	1 (33,3)	
Recidiva				
Negativo	16 (84,2)	12 (75,0)	4 (25,0)	1,000
Positivo	3 (15,8)	3 (100)	0 (0)	

5. DISCUSSÃO

No genoma de mamíferos, a metilação do DNA ocorre em resíduos de citosina de dinucleotídeos CpG. Esta alteração epigenética do DNA é herdável, mas não altera a seqüência de nucleotídeos, em contraste com as modificações genéticas. Desta forma, diferentes das alterações genéticas, as modificações epigenéticas são potencialmente reversíveis. Acredita-se que a metilação do DNA exerça uma função crítica na expressão gênica através de vários mecanismos. Primeiramente, a metilação de ilhas de CpG está associada com a perda da transcrição do gene. Outro mecanismo é a susceptibilidade aumentada à deaminação da 5-metilcitosina e conseqüente mutação de transição para timina. A terceira forma de alteração da expressão gênica seria a indução gênica alterada possivelmente causada pela hipometilação (YANG, YAN e DAVIDSON, 2001).

O padrão de metilação tecido-específico é estabelecido precocemente durante o desenvolvimento através da ação das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs). As ilhas de CpG apresentam-se geralmente desmetiladas em tecidos adultos normais com exceção dos genes transcricionalmente silenciados na inativação do cromossomo X e dos genes imprintados (EGGER *et al.*, 2004). Em contrapartida, a maioria dos tecidos neoplásicos demonstram hipometilação genômica global e hipermetilação localizada nos promotores de certos supressores tumorais críticos e de genes reguladores de crescimento celular (CLARK e MELKI, 2002). O mecanismo responsável pela metilação durante a tumorigênese ainda não foi esclarecido, mas sabe-se que a atividade da DNMT1 está aumentada em células tumorais (ROBERTSON *et al.*, 2000).

As modificações da metilação podem levar em última instância à instabilidade genética característica do câncer de diversas maneiras: mutações de transição pela deaminação hidrolítica da 5-metilcitosina à timina, metilação de genes *caretakers* (como por exemplo genes de reparo do DNA, como *MLH1*) com conseqüente inativação destes genes e a hipometilação global que torna o DNA mais frágil (JONES e BAYLIN, 2002).

Muitas evidências têm demonstrado que a hipermetilação de ilhas de CpG está implicada em perda de expressão de vários genes críticos no câncer de mama. Na sua maioria, os genes silenciados por metilação no câncer de mama podem ser classificados em várias categorias que incluem: reguladores de ciclo celular,

receptores esteróides, detoxificadores de carcinógenos, adesão celular e inibidores de metaloproteinases de matriz (YANG, YAN e DAVIDSON, 2001).

O reconhecimento da importância da metilação e outros eventos epigenéticos na expressão gênica e na malignidade do câncer de mama leva a considerações de como essas descobertas podem ser aplicadas clinicamente. Duas áreas para serem exploradas neste sentido são o uso de marcadores moleculares metilados para detecção e prognóstico, e a aplicação de inibidores de DNMT e HDAC terapeuticamente para re-expressar supressores tumorais e genes inibidores de crescimento celular silenciados (YANG, YAN e DAVIDSON, 2001).

A viabilidade de estratégias baseadas em PCR, como MSP, por exemplo, para acessar modificações de metilação em pequenas quantidades de materiais biológicos aumenta a possibilidade de que a identificação de alelos metilados possa servir como uma forma de acesso ao risco molecular ou ainda à detecção da doença (HERMAN *et al.*, 1996). Além disso, a possibilidade de detectar genes metilados em soro, urina, fluido de lavagem broncoalveolar e linfonodos de indivíduos com vários tipos de câncer tem sido descrita (ESTELLER *et al.*, 1999b *apud* YANG, YAN e DAVIDSON, 2001). Uma aplicação potencial no câncer de mama poderia ser a detecção da metilação de marcadores moleculares usando fluido de lavagem de ducto pelo mamilo ou aspirados de punção de mama, como hipótese de que a presença da metilação nestes marcadores poderia predizer um alto índice de um subsequente desenvolvimento de câncer de mama. Outras aplicações incluem estadiamento molecular de linfonodos sentinela ou aspirados de medula óssea. Esses estudos precisariam primeiramente do desenvolvimento de um painel de metilação em marcadores moleculares que se apresentem desmetilados em tecido normal que poderiam juntos identificar virtualmente todos os tipos de câncer de mama (EVRON *et al.* *apud* YANG, YAN e DAVIDSON, 2001). Além do diagnóstico, outras aplicações clínicas da metilação em marcadores moleculares são a predição do prognóstico e da resposta ao tratamento.

Uma das famílias gênicas que tem sido recentemente correlacionada com processos cancerígenos, podendo seus membros atuar tanto como oncogenes quanto como supressores de tumor (os quais se enquadrariam em algumas categorias citadas anteriormente), é a família de glicoproteínas transmembrânicas ADAM.

Os membros desta família são proteínas formadas por multidomínios. Entre

eles estão os domínios metaloproteinase, que tem a função de clivagem proteolítica, e o domínio disintegrina, que tem função de adesão celular. Os outros domínios que formam a proteína são: uma seqüência sinal, que direciona a proteína ao seu sítio de atividade; um pró-domínio, que tem função de bloquear a atividade de protease (PRIMAKOFF e MYLES, 2000; SEALS e COURTNEIDGE, 2003); uma região rica em cisteína que conecta as ADAMs a moléculas de superfície celular, podendo interagir com sindecans, que podem facilitar interações célula-célula e célula-matriz, possuindo também função de adesão; um domínio EGF-like, com função supostamente de fusão de membranas (ITO *et al.*, 2007); um domínio transmembrana, que ancora a proteína à membrana da célula; e uma cauda citoplasmática que atua como sinalizador intracelular sendo passível de fosforilação (PRIMAKOFF e MYLES, 2000; SEALS e COURTNEIDGE, 2003).

Observamos atualmente um aumento na literatura correlacionando a participação de alguns membros desta família tanto no desenvolvimento quanto na progressão tumoral. Esta correlação se deve às propriedades dos seus membros de atuar na proteólise e adesão celular, que as tornam candidatas a mediar ambos, remodelamento de matriz extracelular e mudanças na adesão celular que caracterizam certos processos patológicos no desenvolvimento tumoral. Além disso, a atividade catalítica de liberação de citocinas e fatores de crescimento parece direcionar a migração celular e controlar várias vias de sinalização ativadas no câncer (ARRIBAS e BECH-SERRA, 2006), além de que, distintas ADAMs podem modular a migração celular mediada por integrinas (HUANG *et al.*, 2005).

Um dos membros desta família, a ADAM23 foi estudada por Costa *et al.* (2004) no contexto da presença de metilação na região promotora do gene provocando o silenciamento da transcrição da proteína ADAM23 no câncer de mama. Neste trabalho, Costa *et al.* (2004) encontraram hipermetilação do promotor do gene *ADAM23* com maior freqüência em estádios mais avançados de câncer de mama. Estes dados e outros obtidos posteriormente por MSP sugerem que a proteína ADAM23 atue como um marcador molecular de metástase (dados não publicados).

No presente trabalho, demos continuidade ao estudo da participação desta família de proteínas no câncer de mama, analisando o padrão de expressão com relação à presença de metilação na região promotora do gene *ADAM33*, cuja proteína, segundo nosso conhecimento, até hoje foi correlacionada apenas com

asma e doenças inflamatórias como psoríase e rinite alérgica.

A proteína ADAM33 contém todos os domínios característicos da família ADAM, incluindo a seqüência consenso de ligação ao zinco no sítio catalítico, que é ativo nas isoformas que o contém. A proteína imatura de aproximadamente 120 kDa (quando purificada sob condições reduzidas) é processada a uma forma madura glicosilada de aproximadamente 100 kDa (isolada nas mesmas condições), cujo domínio catalítico se torna ativo através da clivagem do pró-domínio realizada por mecanismos dependentes de catálise por furinas. A função fisiológica desta proteína ainda não foi determinada, mas em trabalho de caracterização da atividade catalítica da ADAM33, ZOU *et al.* (2004) observaram que a proteína ADAM33 cliva a proteína ligante de KIT (KL-1 – também conhecida como SCF, do inglês Stem Cell Factor). KIT é considerado um receptor de fator de crescimento e é ativado pelo seu ligante SCF. Este par é importante na hematopoiese, melanogênese e fertilidade (ASHMAN, 1999). SCF pode ocorrer de diferentes formas, transmembrana ou solúvel e atua nos múltiplos níveis da hierarquia hematopoiética para promover sobrevivência celular, proliferação, diferenciação, adesão e ativação funcional. Sua maior atuação ocorre em mastócitos. Nestas células o par KIT-SCF promove adesão celular por dois mecanismos distintos. No primeiro, a ligação de SCF transmembrana do estroma ao KIT presente na membrana da célula hematopoiética pode direcionar a fixação. No segundo, a sinalização de SCF através de KIT foi demonstrada aumentar a avidéz de integrinas $\beta 1$ de mastócitos, VLA-4 e VLA-5, pelo componente de matriz extracelular fibronectina. Neste contexto, em melanoma humano, o potencial metastático está correlacionado com a perda de expressão de *KIT*. Por outro lado, o gene *KIT* é um oncogene altamente expresso em LMA (Leucemia mielóide aguda) e tem um efeito positivo no crescimento de câncer de pulmão de pequenas células (ASHMAN, 1999).

Em nosso trabalho, a análise da expressão de *ADAM33* em linhagens tumorais de mama por RT-PCR revelou uma redução significativa da expressão deste gene com relação à linhagem normal de célula epitelial de mama, sendo que em 65% das linhagens tumorais (avaliadas por nós e por IERARDI, 2005) o gene encontra-se desligado. O silenciamento gênico acarretou na ausência da proteína ADAM33 confirmada por ensaio de Western Blotting.

Aqui se faz necessária uma discussão sobre os resultados encontrados na técnica de Western Blotting, na qual a detecção da proteína ADAM33 na linhagem

normal HB4a não se deu nos tamanhos esperados de 100 kDa (proteína madura processada) e 120 kDa (proteína imatura), mas apareceram bandas de aproximadamente 98 e 64 kDa. Garlisi *et al.* (2003) também observaram diferentes tamanhos da proteína ADAM33 em diferentes linhagens celulares, além de terem observado proteínas menores, de aproximadamente 58 kDa em células de musculatura lisa bronquial e de aproximadamente 65 kDa na linhagem de fibroblasto MRC-5. Essas disparidades são provavelmente devidas à diferença na glicosilação da proteína madura e à clivagem da ADAM33 próxima à região transmembrana (GARLISI *et al.*, 2003).

Utilizando a metodologia do tratamento de DNA com bissulfito de sódio seguida de seqüenciamento, foi possível verificar que o silenciamento gênico se dá, na maioria dos casos, devido à presença de metilação em ilhas de CpG na região promotora deste gene. O uso do agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina confirmou o envolvimento da metilação na regulação da expressão deste gene. Em algumas linhagens, esta correlação entre metilação e silenciamento gênico não pôde ser estabelecida. Estes foram os casos das linhagens SK-BR-3 e ZR-75-31. A linhagem SK-BR-3 não apresenta expressão do gene *ADAM33*, mas na análise do seqüenciamento ela se apresenta com uma baixa percentagem de metilação global (19,1%), sendo menor até do que a linhagem normal HB4a (30,8%). Isso significa que deve haver outro mecanismo de regulação da expressão deste gene nesta célula, um dos quais poderia ser a desacetilação das histonas. A mesma falta de expressão é apresentada pela linhagem ZR-75-31, porém desta linhagem não foi possível nem amplificar as ilhas de CpG por PCR *nested*. As especulações acerca deste caso são de que poderia haver um impedimento estérico na região promotora do gene *ADAM33* nesta linhagem, impossibilitando a chegada da *Taq* polimerase ou ainda que o gene poderia ter sofrido deleção.

Com os dados do seqüenciamento, que revelaram quais são os dinucleotídeos importantes para a regulação gênica, foi possível analisar o padrão de metilação em câncer de mama através da técnica de MSP. Para determinar a importância da hipermetilação do gene *ADAM33* como marcador molecular neste tipo de câncer foram avaliadas 73 amostras de tumores primários de mama, cujos resultados foram correlacionados com parâmetros clínico-patológicos já estabelecidos para esta doença. A presença de hipermetilação na região promotora do gene *ADAM33* foi detectada em 39,7% das amostras. A correlação entre o

padrão de metilação e os dados clínico-patológicos das pacientes não apresentou associação estatisticamente significativa para as variáveis: grau tumoral (SBR), estágio clínico (TNM), tamanho do tumor, presença de RE, RP e ERBB2, acometimento de linfonodos, metástase e recidiva, porém a diferença apareceu quando comparados os tipos histológicos de tumor: carcinoma ductal invasivo e carcinoma lobular invasivo. A frequência de metilação em carcinomas lobulares invasivos foi de 76,2% comparados com 25,5% em carcinomas ductais invasivos, o que dá uma diferença estatisticamente significativa com $p=0,0002$.

Os carcinomas lobulares possuem uma baixa frequência na população de mulheres com câncer de mama, em torno de 10-15 %. Este tipo de tumor pode se apresentar como uma massa palpável assim como os carcinomas ductais ou então como lesão mal definida e difusa, com multifocalidade e multicentricidade, o que dificulta sua detecção e diagnóstico inclusive pela mamografia (BIGLIA *et al.*, 2007). Em contraste com IDCs, carcinomas lobulares, tanto *in situ* como invasivos, apresentam falta de coesão entre as células na sua aparência histológica, e possuem morfologia celular singular, similar ao que se vê em linfomas, além disso apresentam perda total de polaridade. A perda da expressão de E-caderina, a mais importante proteína de adesão no epitélio da mama, se reflete na morfologia histológica dos ILCs. A perda de adesão também poderia explicar porque ILCs tendem a metastizar para localizações mais remotas, tais como leptomeninges, trato gastrointestinal e sistema reprodutor feminino, quando comparado com IDCs que metastizam preferencialmente para pulmão, pleura, fígado e ossos (YODER *et al.*, 2007). Nem todos os carcinomas lobulares apresentam perda completa de expressão de E-caderina. Alguns casos de ILCs com baixos níveis de expressão de E-caderina têm sido documentados, implicando que mutações genômicas ou alterações de expressão de RNA em outros genes envolvidos com adesão célula-célula devem existir nestes tumores (HARIGOPAL *et al.*, 2005), sendo possível que *ADAM33* seja um desses genes, considerando-se que ele tenha uma função de adesão assim como o gene *ADAM23*. A interação da *ADAM33* com integrinas também sugere que ela possua função adesiva, ou seja, seu desligamento corrobora com a característica de falta de adesão entre as células nos ILCs.

Outro dado que poderia reforçar esta suspeita é a clivagem de SCF (discutida acima) que, no caso desta clivagem promover a ativação de SCF, *ADAM33* estaria indiretamente promovendo adesão celular, já que SCF se liga a KIT

e faz adesão célula-matriz extracelular. Do contrário, se a clivagem de SCF acaba por inativar o ligante de KIT, o desligamento de *ADAM33* seria interessante para o tumor manter ativo o oncogene *KIT* que estaria superexpresso e precisaria de seu ligante para promover proliferação celular. Todas estas especulações não possuem nenhuma comprovação. Seriam necessários estudos para comprovar ou eliminar estas sugestões da possível função da inativação do gene *ADAM33* em câncer de mama. Além disso, seriam necessários estudos acerca da função fisiológica da proteína *ADAM33*, que permanece desconhecida.

Evidências substanciais demonstram a importância de mecanismos epigenéticos na regulação transcricional de supressores tumorais, supressores de metástase e genes reguladores de crescimento celular críticos no câncer de mama. Estes genes incluem aqueles que possuem funções cruciais no reparo do DNA, na regulação do ciclo celular, no crescimento celular e na adesão célula-célula. Pelas características da proteína *ADAM33* e das evidências discutidas, parece que o produto deste gene auxilia a perda de coesão entre as células nos carcinomas lobulares invasivos, nos quais o gene *ADAM33* é silenciado epigeneticamente. Dessa forma, o gene *ADAM33* poderia ser utilizado como um novo marcador para a diferenciação entre os carcinomas lobulares e ductais, sendo que ocasionalmente as características destes dois tipos de tumores se sobrepõem, principalmente nos casos de carcinomas mistos. Diante disso, existe uma necessidade de se encontrarem marcadores de utilidade clínica (imunohistoquímica, por exemplo) além da E-caderina, para serem usados na diferenciação dos tipos de tumores ao diagnóstico, sendo que até o momento existem poucos marcadores estudados neste sentido (TURASHVILI *et al.*, 2005; TURASHVILI *et al.*, 2007). Estes marcadores também seriam úteis na determinação de metástases de carcinomas lobulares em sítios menos comuns como o trato gastrointestinal, onde elas freqüentemente são confundidas com tumores primários e também em infiltrados lifonodais, onde a distinção entre células de carcinomas lobulares e células linfóides pode ser difícil (BIGLIA *et al.*, 2007). Além da possível utilidade na escolha do tratamento, já que, em relação aos carcinomas ductais, a resposta terapêutica dos carcinomas lobulares é diferente, podendo ser menos responsivos à terapia neoadjuvante (TURASHVILI *et al.*, 2005).

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados deste estudo podemos concluir que:

1. O gene *ADAM33* apresenta uma diminuição significativa de expressão em linhagens tumorais de mama, estando totalmente silenciado em 65% das linhagens analisadas;
2. A presença de hipermetilação na região promotora do gene *ADAM33* promove o silenciamento gênico aos níveis de RNAm e proteína na maioria das linhagens estudadas que não apresentaram expressão gênica;
3. Não há relação entre a hipermetilação da região promotora do gene *ADAM33* com as variáveis clínico-patológicas: grau tumoral (SBR), estágio clínico (TNM), tamanho do tumor, presença de RE, RP e ERBB2, acometimento de linfonodos, metástase e recidiva;
4. O silenciamento gênico promovido pela hipermetilação da região promotora do gene *ADAM33* pode ser indicativo de um novo marcador molecular de carcinomas lobulares invasivos de mama, pois foi observado em 76,2% dos carcinomas lobulares invasivos analisados contra 25,5% dos carcinomas ductais invasivos, apresentando significância estatística.

REFERÊNCIAS

ABRÃO, F.S. **Tratado de oncologia genital e mamária**. São Paulo: Roca, 1995.

ADORJAN, P.; DISTLER, J.; LIPSCHER, E.; MODEL, F.; MÜLLER, J.; PELET, C.; BRAUN, A.; FLORL, A.R.; GÜTIG, D.; GRABS, G.; HOWE, A.; KURSAR, M.; LESCHE, R.; LEU, E.; LEWIN, A.; MAIER, S.; MÜLLER, V.; OTTO, T.; SCHOLZ, C.; SCHULZ, W.A.; SEIFERT, H.H.; SCHWOPE, I.; ZIEBARTH, H.; BERLIN, K.; PIEPENBROCK, C.; OLEK, A. Tumour class prediction and discovery by microarray-based DNA methylation analysis. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, p. e21, 2002.

ANTEQUERA, F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 60, p. 1647-1658, 2003.

ARPINO, G.; BARDOU, V.J.; CLARK, G.M.; ELLEDGE, R.M. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumour characteristics and clinical outcome. **Breast Cancer Research**, v. 6, p. R149-R156, 2004.

ARRIBAS, J.; BECH-SERRA, J.J. ADAMs, cell migration and cancer. **Cancer Metastasis Review**, v. 25, p. 57-68, 2006.

ASHMAN, L.K. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 31, p. 1037-1051, 1999.

BAE, Y.K.; BROWN, A.; GARRET, E.; BORNMAN, D.; FACKLER, M.J.; SUKUMAR, S.; HERMAN, J.G.; GABRIELSON, E. Hypermethylation in histologically distinct classes of breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, v. 10, p. 5998-6005, 2004.

BAYLIN, S.B. Mechanisms underlying epigenetically mediated gene silencing in cancer. **Semin. Cancer Biol.**, v. 12, p.331-337, 2002.

BECK, V.; HEROLD, H.; BENGE, A.; LUBER, B.; HUTZELER, P.; TSCHESCHE, H.; KESSLER, H.; SCHMITT, M.; GEPPERT, H.G.; REUNING, U. ADAM15 decreases integrin α 5 β 3/vitronectin-mediated ovarian cancer cell adhesion and motility in an RGD-dependent fashion. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 37, p. 590-603, 2005.

BENDER, C.M.; GONZALGO, M.L.; GONZALES, F.A.; NGUYEN, C.T.; ROBERTSON, K.D.; JONES, P.A. Roles of cell division and gene transcription in the methylation of CpG Islands. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 10, p. 6690-6698, 1999.

BEN-KAUS, T.; BEN-ZVI, Z.; MARQUEZ, V.E.; KELLEY, J.A.; AGBARIA, R. Metabolic activation of zebularine, a novel DNA methylation inhibitor, in human bladder carcinoma cells. **Biochem. Pharmacol.**, v. 70, p. 121-133, 2005.

BIGLIA, N.; MARIANI, L.; SGRO, L.; MININANNI, P.; MOGGIO, G.; SISMONDI, P.

Increased incidence of lobular breast cancer in women treated with hormone replacement therapy: implications for diagnosis, surgical and medical treatment. **Endocrine-Related Cancer**, v. 14, p. 549-567, 2007.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2008**: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>>. Acesso em 08 mar. 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **TNM**: classificação de tumores malignos. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/tratamento/tnm/tnm2.pdf>>. Acesso 04 abr. 2006.

BRASILEIRO FILHO, Geraldo. **Bogliolo**: patologia geral. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

BREAST cancer invasive? Disponível em: <http://www.breastcancer.org/is_cancer_invasive.html>. Acesso em 08 jan. 2007.

BRIDGES, L.C.; SHEPPARD, D.; BOWDITCH, R.D. ADAM disintegrin-like domain recognition by the lymphocyte integrins alpha4beta1 and alpha4beta7. **Biochem. J.**, v. 387, p. 101-108, 2005.

BROCK, G.J.; HUANG, T.H.; CHEN, C.M.; JOHNSON, K.J. A novel technique for the identification of CpG islands exhibiting altered methylation patterns (ICEAMP). **Nucleic Acids Res.**, v. 29, n. 24, p. E123, 2001.

CAL, S.; FREIJE, J.M.; LOPEZ, J.M.; TAKADA, Y.; LOPEZ-OTIN, C. ADAM23/MDC3, a human disintegrin that promotes cell adhesion via interaction with the alphavbeta3 integrin through an RGD-independent mechanism. **Mol. Biol. Cell.**, v. 11, p. 1457-1469, 2000.

CHAE, S.C.; YOON, K.H.; CHUNG, H.T. Identification of novel polymorphisms in the Adam33 gene. **J. Hum. Genet.**, v. 48, p. 278-281, 2003.

CHEN, C.; HUANG, X.; SHEPPARD, D. ADAM33 is not essential for growth and development and does not modulate allergic asthma in mice. **Molecular and Cellular Biology**, v. 26, 18, p. 6950-6956, 2006.

CHENG, L.; ENOMOTO, T.; HIROTA, T. SHIMIZU, M.; TAKAHASHI, N.; AKAHOSHI, M.; MATSUDA, A.; DAKE, Y.; DOI, S.; ENOMOTO, K.; YAMASAKI, A.; FUKUDA, S.; MAO, X.-Q.; HOPKIN, J.M.; TAMARI, M.; SHIRAKAWA, T. Polymorphisms in ADAM33 are associated with allergic rhinitis due to Japanese cedar pollen. **Clin. Exp. Allergy**, v. 34, n. 8, p. 1192-1201, 2004.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.**, v. 162, p. 156-159, 1987.

CLARK, S.J.; MELKI, J. DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? **Oncogene**, v. 21, n. 35, p. 5380-5387, 2002.

CLARKE, R.; SKAAR, T.; BAUMANN, K.; LEONESSA, F.; JAMES, M.; LIPPMAN, J.; THOMPSON, E. W.; FRETER, C.; BRUNNER, N. Hormonal carcinogenesis in breast cancer: cellular and molecular studies of malignant progression. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 3, p. 237-248, 1994.

COSTA, F.F.; VERBISCK, N.V.; SALIM, A.C.; IERARDI, D.F.; PIRES, L.C.; SASAHARA, R.M.; SOGAYAR, M.C.; ZANATA, S.M.; MACKAY, A.; O'HARE, M.; SOARES, F.; SIMPSON A.J.G.; CAMARGO, A.A. Epigenetic silencing of the adhesion molecule ADAM23 is highly frequent in breast tumors. **Oncogene**, v. 23, p. 1481-1488, 2004.

COSTA, F.F.; PAIXÃO, V.A.; CAVALHER, F.P.; RIBEIRO, K.B.; CUNHA, I.W.; RINCK Jr., J.A.; O'HARE, M.; MACKAY, A.; SOARES, F.A.; BRENTANI, R.R.; CAMARGO, A.A. SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 165, n. 2, p. 135-143, 2006.

DEL MASTRO, R.G.; TURENNE, L.; GIESE, H.; KEITH, T.P.; VAN EERDEWEGH, P.V.; MAY, K.J.W.; LITTLE, R.D. Mechanistic role of a disease-associated genetic variant within the ADAM33 asthma susceptibility gene. **BMC Medical Genetics**, v. 8, p. 46, 2007.

DESIGNED UNIVERSE. **Methylation of CpG Island in DNA.**

<http://www.designeduniverse.com/articles/Nobel_Prize/methylation.jpg>. Acesso em 20 dez. 2006.

DIMRI, G.; BAND, H.; BAND, V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. **Breast Cancer Research**, v. 7, p. 171-179, 2005.

EGGER, G.; LIANG, G.; APARICIO, A.; JONES, P.A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. **Nature**, v. 429, p. 457-463, 2004.

EHRLICH, M. DNA hypomethylation, cancer, the immunodeficiency, centromeric region instability, facial anomalies syndrome and chromosomal rearrangements. **J.Nutr.**, v. 132, p. 2424S-2429S, 2002.

ESTELLER, M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 45, p. 629-656, 2005.

ESTELLER, M. CpG islands hipermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. **Oncogene**, v. 21, p. 5427-5440, 2002.

ESTELLER, M. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hipermethyloome. **Human Molecular Genetics**, v. 16, p. 50-59, 2007.

ETO, K.; HUET, C.; TARUI, T.; KUPRIYANOV, S.; LIU, H.-Z.; PUZON-MCLAUGHLIN, W.; ZHANG, X.-P.; SHEPPARD, D.; ENGVALL, E.; TAKADA, Y. Functional classification of ADAMs based on a conserved motif for binding to Integrin $\alpha_9\beta_1$. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 20, p. 17804-17810, 2002.

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE (EBI). EMBOSS CpGPlot/CpGReport/Isochore. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/emboss/cpgplot/>>. Acesso em: 27 nov. 2006.

FABRE-LAFAY, S.; GARRIDO-URBANI, S.; REYMOND, N.; GONÇALVES, A.; DUBREUIL, P.; LOPEZ, M. Nectin-4, a new serological breast câncer marker, is a substrate for tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (TACE)/ADAM-17. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 19543-19550, 2005.

FARIA, J. L. **Patologia especial com complicações clínicas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

FEINBERG, A.P.; OHLSSON, R.; HENIKOFF, S. The epigenetic progenitor origin of the human cancer. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, p. 21-33, 2006.

FOLEY, S.C.; MOGAS, A.K.; OLIVENSTEIN, R.; FISET, P.O.; CHAKIR, J.; BOURBEAU, J.; ERNST, P.; LEMIÈRE, C.; MARTIN, J.G.; HAMID, Q. Increased expression of ADAM33 and ADAM8 with disease progression in asthma. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 119, n. 4, p. 863-871, Apr. 2007.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **J. Mol. Biol.**, v. 196, n. 2, p. 261-282, 1987.

GARLISI, C.G.; ZOU, J.; DEVITO, K.E.; TIAM, F.; ZHU, F.X.; LIU, J.; SHAH, H.; WAN, Y.; BILLAH, M.M.; EGAN, R.W.; UMLAND, S.P. Human ADAM33: protein maturation and localization. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 301, p. 35-43, 2003.

GIANCOTTI, F.G.; RUOSLAHTI, E. Integrin signaling. **Science**, v. 285, p. 1028-1032, 1999.

GRAHAM, J. D.; YAGER, M. L.; HILL, H. D.; BYTH, K.; O'NEILL G. M.; CLARKE, C. L. Altered progesterone receptor isoform expression remodels progestin responsiveness of breast cancer cells. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 11, p. 2713-2735, Nov. 2005.

GREGER, V.; PASSARGE, E.; HOPPING, W.; MESSMER, E.; HORSTHEMKE, B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. **Hum Genet.**, v. 83, p. 155-158, 1989.

GRUVBERGER, S.; RINGNÉR, M.; CHEN, Y.; PANAVALLY, S.; SAAL, L. H.; BORG, A.; FERNÖ, M.; PETERSON, C.; MELTZER, P. S. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. **Cancer Research**, v. 61, p. 5979-5984, ago. 2001.

HAITCHI, H.M.; POWELL, R.M.; SHAW, T.J.; HOWARTH, P.H.; WILSON, S.J.; WILSON, D.I.; HOLGATE, S.T.; DAVIES, D.E. ADAM33 expression in asthmatic airways and human embryonic lungs. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 171, p. 958-965, 2005.

HANBY, A.M.; HUGHES, T.A. *In situ* and invasive lobular neoplasia of the breast. **Histopathology**, v. 52, p. 58-66, 2008.

HARIGOPAL, M.; SHIN, S.J.; MURRAY, M.P.; TICKOO, S.K.; BROGI, E.; ROSEN, P.P. Aberrant e-cadherin staining patterns in invasive mammary carcinoma. **World J. Surg. Oncol.**, v. 3, p. 73-83, 2005.

HARRIS, R.A.; EICHHOLTZ, T.J.; HILES, I.D.; PAGE, M.J.; O'HARE, M.J. New model of ErbB-2 over-expression in human mammary luminal epithelial cells. **Int. J. Cancer**, v. 80, n. 3, p. 477-484, 1999.

HENKE, W.; HERDEL, K.; JUNG, K.; SCHNORR, D.; LOENING, S.A. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, n. 19, p. 3957-3958, 1997.

HENRY, N. L.; HAYES, D. F. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring and treatment of primary and metastatic breast cancer. **The Oncologist**, v. 11, p. 541-552, 2006.

HERMAN, J.G.; GRAFF, J.R.; MYOHANEN, S.; NELKIN, B.D.; BAYLIN, S.B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, p. 9821-9826, 1996.

HOSPITAL A. C. CAMARGO. **Departamento de mastologia**. Disponível em: <<http://www.hcanc.org.br>>. Acesso em 20 dez. 2006.

HUANG, J.; BRIDGES, L.C.; WHITE, J.M. Selective modulation of integrin –mediated cell migration by distinct ADAM family members. **Molecular Biology of the Cell**, v. 16, p. 4982-4991, 2005.

IERARDI, D.F. **Caracterização do padrão de expressão e metilação dos genes ADAM 12 e 33 em tumores de mama e sua correlação com dados clínico-patológicos**. São Paulo, 2005. Tese (Doutorado em Ciências – Oncologia) – Fundação Antônio Prudente.

IKEDA, K.; INOUE, S. Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. **Arch. Histol. Cytol.**, v. 67, p. 435-442, 2004.

ITO, I.; LAPORTE, J.D.; Fiset, P.O.; ASAI, K.; YAMAUCHI, Y.; MARTIN, J.G.; HAMID, Q. Downregulation of a disintegrin and metalloproteinase 33 by IFN- γ in human airway smooth muscle cells. **Asthma Diagnosis and Treatment**, v. 119, n. 1, p. 89-97, 2007.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; HAO, Y.; XU, J.; MURRAY, T.; THUN, M. J. Cancer statistics, 2008. **CA Cancer J. Clin.**, v. 58, p. 71-96, 2008.

JERÓNIMO, C.; USADEL, H.; HERIQUE, R.; OLIVEIRA, J.; LOPES, C.; NELSON, W.G.; SIDRANSKY, D. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 93, p. 1747-1752, 2001.

JONES, P.A.; BAYLIN, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nature**, v. 3, p. 415-428, 2002.

KARGER, A.E.; HARRIS, J.M.; GESTELAND, R.F. Multiwavelength fluorescence detection for DNA sequencing using capillary electrophoresis. **Nucleic Acid Research**, v. 19, p. 18, p. 4955-4962, 1991.

KATAGIRI, T.; HARADA, Y.; EMI, M.; NAKAMURA, Y. Human metalloprotease/disintegrin-like (MDC) gene: exon-intron organization and alternative splicing. **Cytogenet Cell Genet.**, v. 68, p. 39-44, 1995.

KEEN, J.C.; DAVIDSON, N.E. The biology of breast carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. 3 (Suppl), p. 825-833, 2003.

KVEIBORG, M.; FROHLICH, C.; ALBRECHTSEN, R. A role for ADAM12 in breast tumor progression and stromal cell apoptosis. **Cancer Res.**, v. 65, n. 11, p. 4754-4756, 2005.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 259, p.680-685, 1970.

LAVENS, S.E.; ROVIRA-GRAELLS, N.; BIRCH, M.; TUCKWELL, D. ADAMs are present in fungi: identification of two novel ADAM genes em *Aspergillus fumigatus*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 248, n. 1, p. 23-30, 2005.

LE PABIC, H.; BONNIER, D.; WEWER, U.M.; U.M.; COUTAND, A.; MUSSO, O.; BAFFET, G.; CLÉMENT, B.; THÉRET, N. ADAM12 in human liver cancers: TGF-beta-regulated expression in stellate cells is associated with matrix remodeling. **Hepatology**, v. 37, p. 1056-1066, 2003.

LEADER, J. E.; WANG, C.; FU, M.; PESTELL, R. G. Epigenetic regulation of nuclear steroid receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 1589-1596, 2006.

LEE, Y.K. Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy. **J. Surg. Oncol.**, v. 23, p. 175-180, 1983.

LENDECKEL, U.; KOHL, J.; ARNDT, M.; CARL-MCGRATH, S.; DONAT, H.; ROCKEN, C. Increased expression of ADAM family members in human breast cancer and breast cancer cell lines. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 131, n. 1, p. 41-48, 2004.

LESUEUR, F.; OUDOT, T.; HEATH, S.; FOGLIO, M.; LATHROP, M.; PRUD'HOMME, J-F.; FISCHER, J. ADAM33: a new candidate for psoriasis susceptibility. **PLoS ONE**, v. 2, n. 9, p. e906, 2007.

LINHARES, J. J.; DA SILVA, I. D. C. G.; DE SOUZA, N. C. N.; NORONHA, E. C.; FERRARO, O.; BARACAT, F. F. Polymorphism in genes of the progesterone receptor (PROGINS) in women with breast cancer: a case-control study. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 27, n. 8, p. 473-478, 2005.

LIPSANEN, V.; LEINONEN, P.; ALHONEN, L.; JANNE, J. Hypomethylation of ornithine decarboxylase gene and erb-A1 oncogene in human chronic lymphatic leukemia. **Blood**, v. 72, n. 6, p. 2042-2044, 1988.

LIU, Z. J.; ZHANG, X. B.; ZHANG, Y.; YANG, X. Progesterone receptor gene inactivation and CpG island hypermethylation in human leukemia cancer cells. **FEBS Letters**, v. 567, p. 327-332, 2004

MARTIN, J.; JO, T. Genetic Differences in airway smooth muscle function. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 5, p. 73-79, 2008.

MCCULLOCH, D.R.; HARVEY, M.; HERINGTON, A.C. The expression of the ADAMs proteases in prostate cancer cell lines and their regulation by dihydrotestosterone. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 167, p.11-21, 2000.

MENKE, C.H.; BIAZÚS, J.V.; XAVIER, N.L.; CAVALHEIRO, J.A.; RABIN, E.G.; BITTELBRUNN, A.; CERICATTO, R. **Rotinas em mastologia**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p. 149-155.

METHPRIMER. **Design primers for methylation PCRs**. Disponível em: <<http://www.urogene.org/methprimer/index1.html>>. Acesso em: 28 nov. 2006.

MILLIS, R. R. Correlation of hormone receptors with pathological features in human breast cancer. **Cancer**, v. 15, p. 2869-2871, 1980.

MOCHIZUKI, S.; OKADA, Y. ADAMs in cancer cell proliferation and progression. **Cancer Sci.**, v. 98, n. 5, p. 621-628, 2007.

MOMPARLER, R.L. Cancer epigenetics. **Oncogene**, v. 22, p. 6479-6483, 2003.

MOSS, M.; BARTSCH, J.W. Therapeutic benefits from targeting of ADAM family members. **Biochemistry**, v. 43, p. 7227-7235, 2004.

MOSS, M.L.; WHITE, J.M.; LAMBERT, M.H.; ANDREWS, R.C. TACE and other ADAM proteases as targets for drug discovery. **Drug Discov. Today**, v. 6, p. 417-426, 2001.

NAKAO, M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. **Gene**, v. 278, p. 25-31, 2001.

NAKHLIS, F.; MORROW, M. Ductal carcinoma in situ. **Surg. Clin. North Am.**, v. 83, p. 821-839, 2003.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **Basic local alignment search tool (BLAST)**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>>. Acesso em 27 nov. 2006.

OLIVEIRA, M. A.; SANTOS, G. C.; KANAMURA, C. T. *et al.* Imunoexpressão da proteína Her-2 em punção aspirativa com agulha fina de carcinoma de mama: correlação com os achados da peça cirúrgica. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 25, n.1, p. 23-28, fev. 2003.

ORTH, P.; REICHERT, P.; WANG, W.; PROSISE, W.W.; YAROSH-TOMASINE, T.; HAMMOND, G.; INGRAM, R.N.; XIAO, L.; MIRZA, U.A.; ZOU, J.; STRICKLAND, C.; TAREMI, S.S.; LE, H.V.; MADISON, V. Crystal structure of the catalytic domain of human ADAM33. **J. Mol. Biol.**, v. 335, n. 1, p. 129-37, 2004.

PAGE, D. L.; ANDERSON, T. J. **Diagnostic histopathology of the breast cancer**. New York: Churchill Livingstone, 1987.

PARRELLA, P.; POETA, M.L.; GALLO, A.P.; PRENCIPE, M.; SCINTU, M.; APICELLA, A.; ROSSIello, R.; LIGUORO, G.; SERIPA, D.; GRAVINA, C.; RABITTI, C.; RINALDI, M.; NICOL, T.; TOMMASI, S.; PARADISO, A.; SCHITTULLI, F.; ALTOMARE, V.; FAZIO, V.M. Nonrandom distribution of aberrant promoter methylation of cancer-related genes in sporadic breast tumors. **Clin. Cancer Res.**, v. 10, n. 16, p. 5349-5354, 2004.

POWELL, R.M.; WICKS, J.; HOLLOWAY, J.W.; HOLGATE, S.T.; DAVIES, D.E. The splicing and fate of ADAM33 transcripts in primary human airways fibroblasts. **Am. J. Respir. Cell. Biol.**, v. 31, p. 13-21, 2004.

PRADHAN, S.; ESTEVE, P.O. Mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases and their expression. **Clin.Immunol.**, v. 109, p. 6-16, 2003.

PRIMAKOFF, P.; MYLES, D.G. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends Genet**, v. 16, p. 83-87, 2000.

PROSISE, W.W.; YAROSH-TOMAIN, T.; LOZEWSKI, Z.; INGRAM, R.N.; ZOU, J.; LIU, J.-J.; ZHU, F.; TAREMI, S.S.; LE H.V.; WANG, W. Protease domain of human adam33 produced by *Drosophila* S2 Cells. **Protein Expression and Purification**, v. 38, p. 292-301, 2004.

RADICE, D.; REDAELLI, A. Breast cancer management: quality-of-life and cost considerations. **Pharmacoeconomics**, v. 21, n. 6, p. 383-396, 2003.

ROBERTSON, K.D. DNA methylation and human disease. **Nat. Rev. Genetic.**, v. 6: p. 597-610, 2005.

ROCKS, N.; PAULISSEN, G.; EL HOUR, M.; QUESADA, F.; CRAHAY, C.; GUEDERS, M.; FOIDART, J.M.; NOEL, A.; CATALDO, D. Emerging Roles of ADAM and ADAMTS Metalloproteinases in Cancer. **Biochimie**, v. 90, p. 369-379, 2008.

RODENHISER, D. AND MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **Canadian Medical Association Journal**, v. 174, n. 3, p. 341-348, 2006.

SAGANE, K.; YAMAZAKI, K.; MIZUI, Y.; TANAKA, I. Cloning and chromosomal mapping of mouse ADAM11, ADAM22 and ADAM23. **Gene**, v. 236, p. 79-86, 1999.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.

SANGUINETTI, C. J.; DIAS NETO, E.; DIAS NETO, E.; DIAS NETO, E.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A. J. Recovery and reamplification of PCR products from silver stained polyacrylamide gels. **BioTechniques**, v. 17, n. 5, p. 914-921, Nov. 1994.

SCHWARTZBAUM, J.; AHLBOM, A.; MALMER, B. Polymorphisms associated with asthma are inversely related to glioblastoma multiforme. **Cancer Res.**, v. 65, n. 14, p. 6459-6465, 2005.

SEALS, D.F.; COURTNEIDGE, S.A. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. **Genes Dev.**, v. 17, p.7-30, 2003.

SHAPIRO, S.D.; OWEN, C.A. ADAM-33 surfaces as an asthma gene. **N. Engl. J. Med.**, v. 347, p. 936-938, 2002.

SILVA, D. M.; SADDI, V. A.; MOMOTUK, E. G. Marcadores moleculares associados ao câncer de mama não metastático. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 39-48, 2002.

STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Semin. Cancer Biol.**, v. 10, n. 6, p. 415-433, 2000.

STAMPS, A.C.; DAVIES, S.C.; BURMAN, J.; O'HARE, M.J. Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct. **Int. J. Cancer**, v. 57, n. 6, p. 865-874, 1994.

STEEG, P.S. Control of invasion and metastasis. In: HARRIS, J.R.; LIPPMAN, M.E.; MORROW, M.; OSBORNE, O.K. (Ed.). **Diseases of the breast**. 3th ed. Philadelphia: Lippincot Williams and Wilkins, 2004. p. 457-472.

STYBLO, M.T.; WOOD, W.C. **The breast**: comprehensive management of benign and malignant diseases. 2nd ed. [Philadelphia, PA]: W.B. Saunders, 1998. p. 419-425. (Traditional Prognostic Factors for Breast Cancer).

TAKADA, Y.; YE, X.; SIMON, S. The Integrins. **Genome Biology**, v. 8, p. 215, 2007.

TEODORIDIS, J.M.; STRATHDEE, G.; BROWN, R. Epigenetic silencing mediated by CpG island methylation: potential as a therapeutic target and as a biomarker. **Drug Resist. Updat.**, v. 7, p. 267-278, 2004.

TURASHVILI, G.; BOUCHAL, J.; BURKADZE, G.; KOLÁR, Z. Differentiation of tumours of ductal and lobular origin: I. Proteomics of invasive ductal and lobular breast carcinomas. **Biomed Papers**, v. 149, n. 1, p. 57-62, 2005.

TURASHVILI, G.; BOUCHAL, J.; EHRMANN, J.; FRIDMAN, E.; SKARDA, J.; KOLAR, Z. Novel immunohistochemical markers for the differentiation of lobular and ductal invasive breast carcinomas. **Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech. Repub.**, v. 151, n. 1, p. 59-64, 2007.

TURKER, M. S. Gene silencing in mammalian cells and the spread of DNA methylation. **Oncogene**, v. 21, n. 35, p. 5388-5393, 2002.

UMLAND, S.P.; GARLISI, C.G.; SHAH, H.; WAN, Y.; ZOU, J.; DEVITO, K.E.; HUANG, W.-M.; GUSTAFSON, E.L.; RALSTON, R. Human ADAM33 messenger RNA expression profile and post-transcriptional regulation. **Am. J Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 29, n. 5, p. 571-582, 2003.

UNIVERSITY OF VIRGINIA SCHOOL OF MEDICINE. Department of Cell Biology. **Table of ADAMs**. Disponível em: <<http://people.virginia.edu/~jw7g/>>. Acesso em 18 abr. 2008.

VAN EERDEWEGH, P.; LITTLE, R.D.; DUPUIS, J.; DEL MASTRO, R.G.; FALLS, K.; SIMON, J.; TORREY, D.; PANDIT, S.; MCKENNY, J.; BRAUNSCHWELGER, K.; WALSH, A.; LIU, Z.; HAYWARD, B.; FOLZ, C.; MANNING, S.P.; BAWA, A.; SARACINO, L.; THACKSTON, M.; BENCHEKROUN, Y.; CAPPARELL, N.; WANG,

M.; ADAIR, R.; FENG, Y.; DUBOIS, J.; FITZGERALD, M.G.; HUANG, H.; GIBSON, R.; ALLEN, K.M.; PEDAN, A.; DANZIG, M.R.; UMLAND, S.P.; EGAN, R.W.; CUSS, F.M.; RORKE, S.; CLOUGH, J.B.; HOLLAWAY, J.W.; HOLGATE, S.T.; KELTH, T.P. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. **Nature**, v. 418, p. 426-430, 2002.

VANPOZNAK, C.; SEIDMAN, A.D. Breast Cancer. In: BERTINO, J.R. (Ed.). **Encyclopedia of cancer**. Amsterdam: Academic Press, 2002. p. 287-299.

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W. *et al.* The sequence of the human genome. **Science**, v. 291, p.1304-1351, 2001.

VERMA, M.; SRIVASTAVA, S. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. **The Lancet Oncology**, v. 3, p. 755-763, dez. 2002.

VINA, L. C.; MARTINS, M.; GEBER, S. **Ginecologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

WAGGONER, D. Mechanisms of disease: epigenesis. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 14, p. 7-14, 2007.

WÄRRI, A. M.; SAARINEN, N. M.; MÄKELÄ, S. I. Can modulation of mammary gland development by dietary factors support breast cancer prevention? **Hormone Research**, v. 68, p. 248-260, 2007.

WEI, S.H.; CHEN, C.M.; STRATHDEE, G.; HARNSOMBURANA, J.; SHYU, C.R.; RAHMATPANAH, F.; SHI, H.; NG, S.W.; YAN, P.S.; NEPHEW, K.P.; BROWN, R.; HUANG, T.H. Methylation microarray analysis of late-stage ovarian carcinomas distinguishes progression-free survival in patients and identifies candidate epigenetic markers. **Clin. Cancer Res.**, v. 8, p. 2246-2252, 2002.

WHITE, D.E.; MULLER, W.J. Multifaceted roles of integrins in breast cancer metastasis. **J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v. 12, n. 2-3, p. 135-142, 2007.

WU, E.; CROUCHER, P.I.; MCKIE, N. Expression of members of the novel membrane linked metalloproteinase family ADAM in cells derived from a range of haematological malignancies. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 235, p. 437-442, 1997.

YANG, X.; YAN, L.; DAVIDSON, N.E. DNA methylation in breast cancer. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 8, p. 115-127, 2001.

YODER, B.J.; WILKINSON, E.J.; MASSOL, N.A. Molecular and morphologic distinctions between infiltrating ductal and lobular carcinoma of the breast. **The Breast Journal**, v. 13, n. 2, p. 172-179, 2007.

YOSHINAKA, T.; NISHII, K.; YAMADA, K.; SAWADA, H.; NISHIWAKI, E.; SMITH, K.; YOSHINO, K.; ISHIGURO, H.; HIGASHIYAMA, S. Identification and characterization of novel mouse and human ADAM33s with potencial metalloprotease activity. **Gene**, v. 282, p. 227-236, 2002.

YUAN, Y.; LIU, H.; SAHIN, A.; DAI, J.L. Reactivation of SYK expression by inhibition of DNA methylation suppresses breast cancer cell invasiveness. **Int. J. Cancer**, v. 113, p. 654-659, 2005.

ZOU, J.; ZHU, F.; LIU, J.; WANG, W.; ZHANG, R.; GARLISI, C.G.; LIU, I.H.; WANG, S.; SHAH, H.; WAN, Y.; UMLAND, S.P. Catalytic activity of human ADAM33. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 9818-9830, 2004.

ANEXO 1 - ESTADIAMENTO CLÍNICO

Para nortear as ações de saúde no câncer da mama, uniformizando as condutas, foram criados critérios de estadiamento. Esses critérios procuram estabelecer uma relação entre a doença e o seu prognóstico e, para isso, os casos são colocados em grupos, estadiados de I a IV, formando uma hierarquia importante para o médico que trata de câncer de mama. A União Internacional Contra o Câncer (UICC), a partir dos anos 60, introduziu o sistema TNM (*Tumor, Nodes, Metastasis*, em inglês) e periodicamente o vem revisando, a fim de incorporar os avanços no prognóstico e no tratamento da neoplasia. Outras classificações foram propostas, como o ABCD de Haagensen, que foi bastante usada nas décadas de 60 e 70, e a da American Joint Committee on Cancer (AJCC). Esta última acabou se fundindo com a classificação da UICC e passou a ser padrão no mundo inteiro.

CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA - TNM

Baseia-se no diâmetro máximo do tumor (T), na presença ou não de linfonodos metastáticos na axila (N) e nas metástases à distância, ausentes ou não (M). Para fins de orientação, transcrevemos a classificação da UICC, 6ª edição, publicada em 2003 (Tabela 17.1). Essa nova classificação trouxe em seu bojo os recentes conhecimentos adquiridos com a padronização da técnica do linfonodo sentinela, como o conceito de micrometástases e de células tumorais isoladas, incluindo, também, o modo de detecção destas, se por imuno-histoquímica ou por métodos moleculares. Considerando a classificação da UICC, são estabelecidos grupos por estágio, constituindo a classificação clínica (Tabela 17.2). Ela só se aplica a carcinomas e a tumores primários, virgens de tratamento.

Classificação clínica (cTNM) 6ª edição (UICC), 2003

cT	Tumor primário
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> Carcinoma ductal <i>in situ</i> Carcinoma lobular <i>in situ</i> Doença de Paget da papila sem tumor associado
T1	Tumor menor ou igual a 2 cm T1mic Carcinoma microinvasor T1a Tumor maior que 0,1 cm e menor ou igual a 0,5 cm T1b Tumor maior que 0,5 cm e menor ou igual a 1 cm T1c Tumor maior que 1 cm e menor ou igual a 2 cm
T2	Tumor maior que 2 cm e menor ou igual a 5 cm
T3	Tumor maior que 5 cm
T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão para T4a Parede torácica T4b Edema ou ulceração da pele T4c 4a + 4b T4d Carcinoma inflamatório

Obs.: Parede torácica inclui arcos costais, músculos intercostais e músculo serrátil anterior, mas não o músculo peitoral. Doença de Paget associada a tumor é classificada de acordo com o tamanho do tumor.

cN Linfonodos regionais

Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase para linfonodos regionais
N1	Metástase para linfonodos axilares ipsilaterais móveis
N2	 N2a Metástase para linfonodos axilares coalescentes ou aderidos a estruturas adjacentes N2b Metástase clinicamente aparente na mama interna na ausência de metástase axilar
N3	 N3a Metástase para linfonodo infraclavicular

cM	N3b	Metástase para linfonodo da mama interna e axilar
	N3c	Metástase para linfonodo supraclavicular
	Metástase à distância	
	Mx	Metástase à distância não pode ser avaliada
	M0	Ausência de metástase à distância
	M1	Presença de metástase à distância

Classificação patológica (pTNM) 6ª edição (UICC)

pT	Tumor primário
pTx	Tumor primário não pode ser avaliado
pT0	Não há evidência de tumor primário
pTis	Carcinoma <i>in situ</i> Carcinoma ductal <i>in situ</i> Carcinoma lobular <i>in situ</i>
	Doença de Paget do mamilo sem tumor associado*
pT1	Tumor menor ou igual a 2 cm pT1mic Carcinoma microinvasor pT1a Tumor maior que 0,1 cm e menor ou igual a 0,5 cm pT1b Tumor maior que 0,5 cm e menor ou igual a 1 cm pT1c Tumor maior que 1 cm e menor ou igual a 2 cm
pT2	Tumor maior que 2 cm e menor ou igual a 5 cm
pT3	Tumor maior que 5 cm
pT4	Tumor de qualquer tamanho com extensão para pT4a Parede torácica pT4b Edema ou ulceração da pele pT4c 4a + 4b

*Doença de Paget associada com tumor é classificada de acordo com o tamanho da lesão.

pN Linfonodos regionais

pN	pNx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
	pN0	Ausência de metástase para linfonodos regionais
	pN0	(i -/+)**
	pN0	(MOL -/+)**
pN1	pN1mi	Micrometástase (maior que 0,2 mm e menor ou igual a 2 mm) em axila ou CMI
	pN1a	1 a 3 linfonodos axilares ipsilaterais comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2 mm
	pN1b	Linfonodos da mama interna com metástase microscópica identificada em linfonodo sentinela, mas não clinicamente aparente
pN2	pN1c	1 a 3 linfonodos axilares comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2 mm e linfonodos da mama interna com metástase microscópica sem linfonodos sentinela, mas não clinicamente aparente
	pN2a	4 a 9 linfonodos axilares comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2 mm
pN3	pN2b	Linfonodos da mama interna clinicamente aparentes na ausência de comprometimento axilar
	pN3a	10 linfonodos axilares comprometidos incluindo pelo menos uma metástase maior que 2 mm
	ou	
	--	Linfonodo infraclavicular ipsilateral comprometido
	pN3b	Linfonodos da mama interna clinicamente comprometidos na presença de comprometimento de linfonodos axilares
	ou	
	--	Mais de 3 linfonodos axilares comprometidos e linfonodos da mama interna com metástase microscópica identificada em linfonodo sentinela, mas não clinicamente aparente
	pN3c	Linfonodo(s) supraclavicular ipsilateral comprometido

** Casos em que a metástase linfonodal consiste em apenas células tumorais isoladas ou formando agrupamentos menores que 0,2 mm, que, em sua maioria, são detectados pela imunoistoquímica (i) ou por biologia molecular (MOL), são classificados como pN0, pois tipicamente não mostram evidência de atividade metastática.

pM Metástase a distância

pMx	Metástase à distância não pode ser avaliada
pM0	Ausência de metástase à distância
pM1	Presença de metástase à distância

Resumo

		<i>Classificação por estádios</i>	
Estádio 0 Tis	N0 M0	Estádio IIIA	T0 N2 M0
Estádio I T1*	N0 M0		T1* N2 M0
Estádio IIA	T0 N1 M0		T2 N2 M0
	T1* N1 M0		T3 N1, N2 M0
	T2 N0 M0	Estádio IIIB	T4 N0, N1, N2, M0
Estádio IIB	T2 N1 M0	Estádio IIIC	Qualquer T N3 M0
	T3 N0 M0	Estádio IV	Qualquer T, Qualquer N M1

*T1 inclui T1 mic.

GRAU TUMORAL (SBR)

O estadiamento tumoral, especialmente quando realizado por patologistas treinados, correlaciona-se bem com o prognóstico clínico. Os sistemas de estadiamento mais utilizados para o câncer de mama são a classificação de Scarff-Bloom-Richardson (SBR), o qual foi modificado pelo grupo de Nottingham.

O grau de diferenciação é avaliado de acordo com a habilidade do tumor em originar formações tubulares, glandulares ou papilares. O pleomorfismo descreve a forma do núcleo. O índice mitótico avalia o número de mitoses encontrados na amostra do tumor. A soma dos pontos dos três componentes determina os graus: 1 (bem diferenciado), 2 (moderadamente diferenciado) e 3 (fracamente diferenciado). Pacientes com um escore de SBR de 3 apresentam um risco relativo de 4,4 comparado com aquelas com um escore de SBR de 1 para tempo livre de doença por cinco anos.

O grau histológico é aplicável a todos os carcinomas mamários. Ele tende a aumentar junto com o tamanho tumoral e o acometimento linfonodal, com importante influência negativa no prognóstico.

Fonte: MENKE, BIAZÚS, XAVIER *et al.*, 2007. p. 158, 163 a 165.

ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial (exame de sangue). E, entendendo que os riscos de minha participação nesta pesquisa são mínimos.

Entendo que minha participação é inteiramente voluntária, podendo me recusar a responder qualquer questão ou retirar o meu consentimento em participar neste estudo a qualquer hora, sem nenhum prejuízo ao meu tratamento atual ou futuro.

Eu, _____, após ter lido e entendido todas as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo, concordo voluntariamente em participar do mesmo. Atesto também o recebimento das “Informações ao doador”, necessário para a minha compreensão do estudo.

_____ Data: __/__/__

Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

Eu, Prof. Dr. Iglenir João Cavalli, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao doador.

_____ Data: __/__/__

Prof. Dr. Iglenir João Cavalli

[illegible]

Legenda: C: dinucleotídeo metilado; T: dinucleotídeo não metilado; ?: não determinado. Os números na primeira linha da tabela são correspondentes aos 77 CpGs que foram clonados e seqüenciados da ilha-1.

ANEXO 4 – TABELA DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS 76 PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA OU FIBROADENOMA UTILIZADOS EM ANÁLISES DE MSP DO GENE *ADAM33* E RESULTADOS DA TÉCNICA

Nº amostra	Fibro-adenoma	Idade Paciente	Tamanho (mm)	Linfonodos	RE	RP	ERBB2	Estadio	recidiva	metástase	óbito	MSP U	MSP M
1	CP163	44	12	-	nd	nd	Nd	nd	-	-	-	+	-
2	CP179	18	48	Nd	nd	nd	Nd	nd	+	-	-	+	-
3	CP235	15	28	-	nd	nd	Nd	nd	-	-	-	+	-
Nº amostra	CD 'in situ'	Idade Paciente	Tamanho (TNM)	Linfonodos	RE	RP	ERBB2	Estadio	recidiva	metástase	óbito	MSP U	MSP M
4	CP025	79	Tis	Nd	nd	nd	Nd	0	nd	nd	nd	+	-
Nº amostra	CDI GI	Idade Paciente	Tamanho (TNM)	Linfonodos	RE	RP	ERBB2	Estadio	Recidiva	Metástase	Óbito	MSP U	MSP M
5	CP162	49	T1	-	+	+	Nd	I	-	-	-	+	+
6	CP287	83	T1	-	+	+	Nd	I	-	-	-	+	-
7	CP323	50	T2	-	+	nd	-	IIA	-	-	-	+	-
8	CP332	30	T2	-	+	+	+	IIA	-	-	-	+	-
9	CP402	68	T2	+	+	+	-	IIB	-	-	-	+	-
10	CP408	60	T2	-	+	+	-	IIA	-	-	-	+	-
11	CP425	72	T2	-	+	+	+	IIA	-	-	-	+	-
12	CP456	75	T1	-	+	+	+	I	-	-	-	+	+
13	CP460	66	T1	-	+	+	+	I	-	-	-	+	-
14	CP471	52	T2	+	+	+	-	IIB	-	-	-	+	+
15	CP515	63	T1	-	+	+	-	I	-	-	-	+	-
16	CP528	42	T1	-	+	+	-	I	-	-	-	+	-

Continua...

ANEXO 4 – TABELA DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS 76 PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA OU FIBROADENOMA UTILIZADOS EM ANÁLISES DE MSP DO GENE *ADAM33* E RESULTADOS DA TÉCNICA

Nº amostra	CDI GII	Idade Paciente	Tamanho (TNM)	Linfonodos	RE	RP	ERBB2	Estadio	Recidiva	Metástase	Óbito	MSP U	MSP M
17	CP172	68	T2	+	+	+	-	IV	-	+	+	+	-
18	CP174	51	T3	+	+	+	+	IV	-	+	+	+	-
19	CP197	66	T1	+	-	-	+	IIA	-	-	-	+	-
20	CP271	47	T2	+	+	nd	-	IIB	-	-	+	+	-
21	CP290	71	T1	Nd	+	nd	-	pT1,pNX,pMx	-	-	-	+	+
22	CP314	74	T2	-	+	+	+	IIA	-	-	-	+	-
23	CP337	62	T2	-	+	+	-	IV	-	+	+	+	-
24	CP341	73	T2	+	+	+	-	IIB	-	-	-	+	-
25	CP365	39	T2	+	+	-	-	IIB	-	-	-	+	-
26	CP366	63	T2	-	+	-	+	IIA	-	-	-	+	-
27	CP413	83	T2	+	+	+	-	IIB	-	-	-	+	+
28	CP487	68	T1	-	+	+	-	I	-	-	-	+	-
29	CP497	45	T1	+	+	+	-	IV	-	+	-	+	-
30	CP520	71	T4	+	+	+	+	IIIC	-	-	-	+	+
31	CP527	53	T2	+	-	-	+	IIIA	-	-	-	+	-
32	CP532	56	T2	+	+	+	-	IIIC	-	-	-	+	-
33	CP536	40	T2	+	+	+	+	IIIC	-	-	-	+	-
34	CP542	40	T2	+	+	+	+	IIA	-	-	-	+	-
35	CP547	54	T2	+	+	+	-	IIIA	-	-	-	+	-
36	CP556	63	T2	-	+	+	-	IIA	-	-	-	+	+

Continua...

ANEXO 4 – TABELA DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS 76 PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA OU FIBROADENOMA UTILIZADOS EM ANÁLISES DE MSP DO GENE *ADAM33* E RESULTADOS DA TÉCNICA

37	CP562	49	T2	+	+	+	+	IIIA	-	-	-	+	-
38	CP427	55	T1	+	+	+	+	IV	-	+	nd	+	+
Nº amostra	CDI GIII	Idade Paciente	Tamanho (TNM)	Linfonodos	RE	RP	ERBB2	Estadio	Recidiva	Metástase	Óbito	MSP U	MSP M
39	CP243	48	T4	+	+	+	-	IIIB	nd	+	+	+	+
40	CP310	56	T1	+	+	+	+	IIA	-	-	-	+	-
41	CP338	44	T2	-	-	-	-	IIA	-	-	-	+	-
42	CP399	82	T2	+	+	+	-	IIB	-	-	-	+	-
43	CP422	75	T4	-	+	+	-	IV	+	+	+	+	-
44	CP424	63	T2	+	+	-	-	IIB	-	-	-	+	+
45	CP432	66	T4	+	+	+	-	IIIB	-	-	-	+	-
46	CP434	59	T2	+	-	-	-	IV	-	+	+	+	-
47	CP470	67	T2	-	+	+	-	IIA	-	-	-	+	-
48	CP505	72	T4	+	-	-	+	IV	+	+	+	+	-
49	CP525	45	T3	+	+	+	-	IIIA	-	-	-	+	+
50	CP537	69	T2	-	-	-	+	IIB	+	-	-	+	+
51	CP539	55	T1	+	-	-	+	IIA	-	-	-	+	-
52	CP545	27	T3	-	-	-	-	IIB	-	-	-	+	-
53	CP558	51	T1	-	+	+	+	I	-	-	-	+	-
54	CP559	79	T2	-	-	-	+	IV	-	+	+	+	-
55	CP430	54	T4	+	-	nd	nd	IIIB	-	-	-	+	+

Continua...

ANEXO 4 – TABELA DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS 76 PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA OU FIBROADENOMA UTILIZADOS EM ANÁLISES DE MSP DO GENE *ADAM33* E RESULTADOS DA TÉCNICA

Nº amostra	CLI GI	Idade Paciente	Tamanho (TNM)	Linfonodos	RE	RP	ERBB2	Estadio	Recidiva	Metástase	Óbito	MSP U	MSP M
56	CP319	68	T2	-	+	+	-	IIA	-	-	-	+	+
57	CP389	84	T2	-	nd	nd	nd	IIA	-	-	-	+	+
58	CP476	71	T3	+	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	+	+
59	CP485	59	T1	-	+	+	-	I	-	-	-	+	-
60	CP501	53	T1	-	+	+	-	I	-	-	-	+	-
61	CP300	65	T1	-	+	+	-	I	+	-	-	+	+
62	CP339	53	T2	+	+	nd	-	IIB	-	+	+	+	+
Nº amostra	CLI GII	Idade Paciente	Tamanho (TNM)	Linfonodos	RE	RP	ERBB2	Estádio	Recidiva	Metástase	Óbito	MSP U	MSP M
63	CP256	55	T2	+	+	+	-	IIB	-	-	-	+	+
64	CP390	44	T1	-	+	+	-	I	-	-	-	+	+
65	CP420	52	T2	-	+	+	-	IIA	-	-	-	+	+
66	CP445	46	T3	+	+	+	-	IIIA	-	-	-	+	+
67	CP506	55	T3	+	+	+	-	IV	-	+	+	+	-
68	CP535	79	T1	-	+	-	-	I	-	-	-	+	-
69	CP297	76	T3	-	+	+	-	IIA	+	nd	nd	+	+
70	CP412	42	T2	-	+	nd	-	IIA	-	-	-	+	+
71	CP574	45	T2	+	-	-	-	nd	-	-	-	+	+
72	CP585	66	T2	+	+	-	-	IIB	-	-	-	+	+
73	CP529	46	T3	-	+	+	+	IIIA	-	-	-	+	+

Continua...

ANEXO 4 – TABELA DOS DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DAS 76 PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA OU FIBROADENOMA UTILIZADOS EM ANÁLISES DE MSP DO GENE *ADAM33* E RESULTADOS DA TÉCNICA

Nº amostra	CLI GIII/nd	Idade Paciente	Tamanho (TNM)	Linfonodos	RE	RP	ERBB2	Estádio	Recidiva	Metástase	Óbito	MSP U	MSP M
74	CP202	55	T2	+	+	nd	nd	IIB	-	-	-	+	+
75	CP196/nd	77	T4	-	-	nd	+	IIIB	+	+	+	+	+
76	CP340/nd	55	T2	+	nd	nd	nd	IIB	nd	nd	nd	+	-

Legenda: CD: carcinoma ductal; CDI carcinoma ductal invasivo; CLI: carcinoma lobular invasivo; G: grau histológico (SBR); CP: número do cadastro da paciente no Banco de Tumores; TNM: classificação tumoral por tamanho, acometimento de linfonodos e presença de metástase; Tis: carcinoma *in situ*; RE: receptor de estrógeno; RP: receptor de progesterona; ERBB2: receptor de fator de crescimento ERBB2; MSP: PCR específico para Metilação; U: não metilado; M: metilado; nd: não determinado.